

I N A U G U R A L – D I S S E R T A T I O N

zum Erwerb des Grades Dr. rer. nat.
der physikalischen Fakultät der Universität GH Essen

vorgelegt von Dipl.-Phys. Thomas Radtke aus Aurich im Mai 1999

Gutachter: Prof. Dr. O. Bryngdahl
 Prof. Dr. C. Streffer

Tag der Disputation: 6. September 1999

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Graham

Rekonstruktion und Quantifizierung von Chromosomendomänen in Interphasezellen

Thomas Radtke

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Biologische Grundlagen	5
2.1.1 Der Zellzyklus aus zytometrischer und optischer Sicht	5
2.1.2 Quantifizierung durch DNA-Farbstoffe	7
2.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	8
2.1.4 Die Chromosomenstruktur im Interphasekern	10
2.2 Physikalische Grundlagen	12
2.2.1 Das konfokale Laserscanning-Mikroskop	12
2.2.1.1 Mechanischer Aufbau und strahlenoptisches Prinzip	12
2.2.1.2 Die Punktverwaschungsfunktion im CLSM	14
2.2.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	16
2.2.2 Simulation der Lichtstreuung	17
2.2.2.1 Die Maxwellschen Gleichungen	17
2.2.2.2 Die numerische Lösung der Maxwell-Gleichungen	17
2.2.2.3 Der Hertzsche Dipol	18
2.2.3 Bildverarbeitung	20
2.2.3.1 Rauschfilter	20
2.2.3.1.1 Zeitlich gemittelte Messungen	20
2.2.3.1.2 Räumliche gemittelte Messungen	20
2.2.3.1.3 Tiefpaßfilter	20
2.2.3.1.4 Räumliche und zeitliche Median-Filterungen	21
2.2.3.1.5 Das nichtlineare anisotrope Diffusionsfilter	22
2.2.3.2 Restauration	23
2.2.3.2.1 Das Inverse Filter	23

2.2.3.2.2 Das Wiener Filter	23
2.2.3.2.3 Das Tikhonov-Miller Filter	23
2.2.3.2.4 Der ICTM Algorithmus	24
2.2.3.3 Mathematische Morphologie	25
2.2.3.3.1 Die Grundoperatoren	25
2.2.3.3.2 Opening und Closing	28
2.2.3.4 Metrik	29
2.2.3.5 Nachbarschaft	29
2.2.3.6 Segmentierung	29
2.2.3.6.1 Zusammenhängende Gebiete mit definierten Eigenschaften	30
2.2.3.6.2 Segmentierung mit globalem Schwellenwert	31
2.2.3.6.3 Segmentierung mit Hysterese	31
2.2.3.6.4 Watershed Segmentierung	31
2.2.3.7 Bestimmung des Schwellenwertes ohne a priori Wissen	33
2.2.3.8 Quantifizierung der Segmente	33
2.2.3.8.1 Gesamtintensität	33
2.2.3.8.2 Volumen	33
2.2.3.8.3 Oberfläche	34
2.2.3.8.4 Position und Lage	36
3 Experimentelle Grundlagen	37
3.1 Biologische Grundlagen	38
3.1.1 Präparation	38
3.1.1.1 Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung	38
3.1.1.2 Färbung der DNA	39
3.1.2 Oberfläche der Chromosomendomänen	40
3.2 Physikalische Grundlagen	41
3.2.1 Messung des Signal/Rausch-Verhältnisses	41
3.2.2 Analyse der Lichtausbreitung in Chromosomendomänen	43
3.2.2.1 Streuung als Störung in der Abbildung	43
3.2.2.2 Das Modell	43
3.2.2.3 Die numerische Berechnung im Modell	44
3.2.3 Testobjekte zur Vermessung des Mikroskops	46
3.2.4 Visualisierung	47

3.2.4.1 Korrektur der Intensitätsübertragung	47
3.2.4.2 Plastische Abbildung	47
3.2.5 Beschreibung des Meßplatzes	52
4 Resultate	53
4.1 Die Vorgehensweise bei Messung und Auswertung	54
4.2 Eigenschaften des Mikroskops	55
4.2.1 Linearität der Messung	55
4.2.2 Die Punktverwaschungsfunktion	59
4.2.3 Chromatische Abberation	62
4.2.4 Die RMS in Abhängigkeit vom Grauwert	63
4.2.5 Die Verteilung des Rauschens	65
4.2.6 Fading	67
4.3 Filterung der Punktverwaschungsfunktion	70
4.3.1 Das inverse Filter	70
4.3.2 Das Wiener Filter	72
4.3.3 Das ICTM Filter	73
4.4 Segmentierer	74
4.4.1 Der rekursive Segmentierer “RAWS”	74
4.4.1.1 Hintergrund	74
4.4.1.2 Der adaptive “Random Walk Segmentierer” RAWS	75
4.4.1.3 Nachbarschaftserhaltung	76
4.4.2 Vor- und Nachbehandlungen	79
4.4.2.1 Vorwissen über die Morphologie nutzen	79
4.4.2.2 Closing	79
4.4.2.3 Tiefpaßfilterung	80

4.4.2.4 Zellulärer Automat	80
4.4.2.5 Spezielle Nachbehandlung für die Oberflächenschätzung	81
4.5 Streuung im Chromatin	83
4.5.1 Implementierung des Algorithmus	83
4.5.2 Abbildung eines Hertzschen Dipolstrahlers	85
4.6 DNA-Messung in Metaphasechromosomen	87
4.6.1 Messung der Fluoreszenz in situ hybridisierten Chromosomen	87
4.6.2 Messung der nicht-hybridisierten Chromosomen	90
4.6.3 Ergebnisse der DNA-Messungen	91
4.7 DNA-Messung in Interphasechromosomen	92
4.7.1 DNA-Gehalt der homologen Chromosomen	92
4.7.2 Schwellenwertbestimmung durch den ITS-Algorithmus	94
4.7.3 Die Anwendung eines mehrstufigen Verfahrens	97
4.8 Bestimmung der Volumina von Kern und Domänen	100
4.8.1 Das Kernvolumen	100
4.8.2 Das Volumen der Chromosomendomänen	101
4.9 Oberfläche der Chromosomendomänen	103
4.10 Position und Lage der Domänen	105
4.11 Dreidimensionale Visualisierung	107
5 Diskussion	122
6 Zusammenfassung und Ausblick	128
7 Glossar	131
8 Literatur	137

1

Einleitung

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Frage nach der Struktur der Chromosomen einer Zelle während ihrer Interphase, speziell nach den morphologischen Eigenschaften der kompakten (Zorn et al. 1979) Aufenthaltsbereiche der Chromosomen (der *Domänen*). Um hierauf Antworten geben zu können, muß ein System etabliert werden, das sich aus den biologischen Gegebenheiten in *humanen Lymphozytenkernen* definiert:

Die Chromosomen der Interphasezelle sind mit Licht-Mikroskopen nicht voneinander zu diskriminieren. Wird die DNA mit einem stöchiometrisch bindenden Farbstoff markiert, so erkennt man lediglich den vom Euchromatin unterschiedlichen (höheren) DNA-Gehalt pro Volumen (die *DNA-Dichte*) des Heterochromatins sowie ggf. die ungefärbten Nukleoli (Ambrose u. Easty 1970).

Die chromosomale DNA ist während der Interphase im kugelförmigen Lymphozytenkern lokalisiert, so daß die Domänen, die die DNA einzelner Chromosomen beinhalten, eine quasi-beliebig räumliche Orientierung besitzen können. Bislang existieren nur Hinweise auf die relative Orientierung des *homologen* Chromosomenpaares 1 zueinander (Boei et al. 1998).

Die Interphase teilt sich in die G_1 , S und G_2 Phasen (G=Gap, S=Synthese) auf, die für die Zelle unterschiedliche Bedeutung haben.

Die Untersuchung eines bestimmten Chromosoms erfordert eine spezifische Markierung, die durch die "Fluoreszenz in situ Hybridisierung" (FISH) realisiert wird. Um die räumliche Struktur zu erfassen, müssen mikroskopische Aufnahmen in verschiedenen Tiefen des Kerns gemacht werden, ohne hierbei eine allzu starke Degradierung des Bildes durch die Fluoreszenz außerhalb der fokalen Ebene in Kauf zu nehmen. Das konfokale Fluoreszenzmikroskop zeichnet sich durch eine gute axiale Diskriminierung der Fluoreszenz aus und wird daher zur Messung eingesetzt. Da vermutet werden muß, daß die Chromosomen nicht immer die identische Struktur während der Interphase haben, stützen sich diese Untersuchungen auf nicht-proliferierende Zellen, die sich in der G_0 -Phase (vergleichbar mit der G_1 -Phase proliferierender Zellen) befinden. Es handelt sich hierbei um humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Normalspenderin.

Die Qualität der Bildaufzeichnung wird durch die Einstellungen des Mikroskops bestimmt. Diese Arbeit wird zeigen, wie sich charakteristische Größen, welche die Bildqualität ausmachen, experimentell bestimmen lassen. Die wichtigsten dieser Größen sind die Verbreiterung einer Punktlichtquelle in einer Messung und das Signal/Rausch-Verhältnis, das ganz wesentlich durch das Detektorsystem des Mikroskops bestimmt wird. Die Verbreiterung, die durch die Punktverwaschungsfunktion (PSF, *Point Spread Function*) verursacht wird, kann durch eine Lochblende in der fokalen Ebene des Detektionssystems in bestimmten Grenzen beeinflußt werden. Es ist zu beachten, daß eine kleine Lochblende

zwar eine schmalere PSF zur Folge hat, jedoch die Beschleunigungsspannung am Detektor heraufgeregelt werden muß, um den Abfall der gemessenen Intensität zu kompensieren, wodurch gleichzeitig eine Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses eintritt.

Die Meßwerte sind, nicht zuletzt wegen ihrer Dreidimensionalität, visuell schwer interpretierbar. Aus diesem Grund und weil eine möglichst genaue Quantifizierung erfolgen soll, wird eine dreidimensionale Bildverarbeitung entwickelt, mit der die Chromosomendomänen rekonstruiert und charakterisiert werden können. Der Hintergrund dieser Charakterisierung liegt in der strahlenbiologischen Überlegung, Unterschiede zwischen intakten und geschädigten Chromosomen in der Interphase aufzudecken zu wollen. Interessante Eigenschaften sind in diesem Zusammenhang der DNA-Gehalt, das Volumen und die Oberfläche der Domänen (Eils et al. 1996). Insbesondere die Oberfläche stellt eine schwer quantifizierbare Größe dar. In dieser Arbeit wird sie im wesentlichen durch einen Schritt der Vorverarbeitung definiert, der für eine Glättung der Domänen-Außenseiten sorgt, so daß die durch das Rauschen verursachten Feinstrukturen unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops unberücksichtigt bleiben.

2

Theoretische Grundlagen

2.1 Biologische Grundlagen

2.1.1 Der Zellzyklus aus zytometrischer und optischer Sicht

Der Zellzyklus läßt sich in die Interphase und die Mitose unterteilen. Während innerhalb der Interphase unter anderem ein kleiner Teil der im Zellkern enthaltenen DNA, z.B. für die Proteinsynthese, transkribiert wird, stellt die Mitose die Phase der Zellteilung dar. In dieser Zeitspanne kondensiert das Chromatin, welches die DNA enthält, zu sichtbaren Chromosomen, die sich nun unter dem Lichtmikroskop erkennen lassen.

Hetero- und Euchromatin haben in der Interphase im Größenbereich optischer Wellenlängen überwiegend konstante optische Dichten, wie Betrachtungen mit Phasenkontrast- und Differenzkontrastmikroskopen zeigen und füllen den gesamten Zellkern aus. Die Chromosomen, die im wesentlichen aus DNA und Proteinen bestehen, sind optisch nicht voneinander zu diskriminieren (Bild 1, links).

In Zellen, die einen vollständigen Zyklus durchlaufen, wird die DNA in einem Abschnitt der Interphase, der Synthese-Phase (*S*-Phase), kopiert und der doppelte Chromatidensatz erzeugt.

Die G_1 - und G_2 -Phasen (‘‘Gap’’-Phasen), ebenfalls Abschnitte der Interphase, liegen zeitlich vor, respektive im Anschluß an die *S*-Phase und spielen für die Reparaturaktivität der Zelle eine zentrale Rolle. Innerhalb dieser Phasen wird keine semikonservative DNA-Synthese, außer zum Zweck der Reparatur, durchgeführt.

In der G_1 - Phase enthält der Zellkern den einfachen, in der G_2 -Phase den durch die Synthese verdoppelten DNA-Gehalt. Zellen, die sich nicht teilen, verbleiben in der G_0 -Phase.

In der sich an die G_2 -Phase anschließenden Mitose, der Zellteilungsphase, kondensiert die DNA zu Chromosomen, die nun optisch im Phasenkontrast- und Differenzkontrast-Mikroskop unterschieden werden können (Bild 1, rechts).

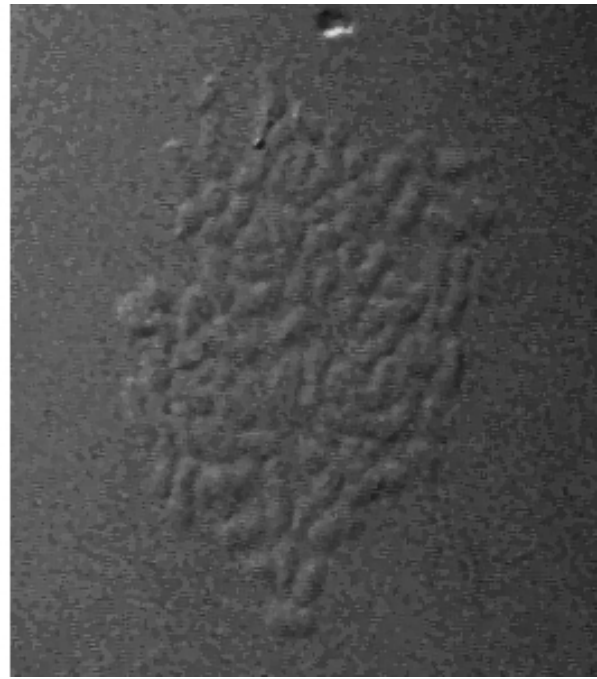
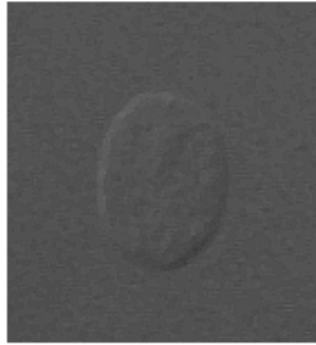


Bild 1: Unter dem Differenzkontrastmikroskop sind im Interphasekern einer menschlichen Lymphozytenzelle (linkes Bild) keine diskret liegenden Chromosomen zu sehen, wie der “Metaphasespread”¹ sie im rechten Bild zeigt. Beide Aufnahmen haben die gleiche Skalierung.

¹ Mitotische Zellen können durch den hypotonischen Schock zum “Platzen” gebracht werden, so daß die Chromosomen sich flächig auf einem Objektträger verteilen.

2.1.2 Quantifizierung durch DNA-Farbstoffe

Die DNA besteht aus zwei Rückgrätern (Backbones) einer alternierenden Folge von Phosphatgruppen und Zuckermolekülen, die in charakteristischer Weise durch angehängte Nukleinbasen miteinander verbunden sind und eine Doppelhelix ausbilden. Die Basen sind jeweils durch zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen untereinander verbunden, so daß sich Kombinationen, sogenannte Basenpaare, aus den Purinen Adenin und Guanin sowie den Pyrimidinen Thymin und Cytosin ergeben. Die beiden möglichen Kombinationen sind Adenin/Thymin (AT) und Guanin/Cytosin (GC) (Watson u. Crick 1953).

Um Messungen mit Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopen durchzuführen, kann die DNA durch absorbierende bzw. fluoreszierende Farbstoffe markiert werden. Ein Maß für den DNA-Gehalt ist die Anzahl an Basenpaaren (*base pair*, bp). Eine relative Messung ist mit einem stöchiometrischen DNA-Farbstoff möglich.

Im Falle des DNA-Farbstoffes Propidium-Jodid (PJ) ergibt sich bei Anregung mit grünem (580 nm) Licht eine rote (605 nm) Fluoreszenz. Die Bindung des Farbstoffes an die DNA erfolgt sowohl durch Interkalation als auch ionisch. Die ionische Bindung ist um etwa zwei Größenordnungen stärker als die interkalierende (Pauluhn et al. 1980). Unter physiologischen Bedingungen binden die PJ-Moleküle im Mittel im Abstand von vier bis fünf Basenpaaren an die DNA. Die Anregungs- und Emissionsspektren von an die DNA gebundenem PJ sind um etwa +35 nm bzw. -15 nm gegenüber freiem PJ verschoben und seine Fluoreszenz ist um einen Faktor 20 bis 30 angehoben.

Die ionische Bindungskonstante ist vom Salzgehalt abhängig, da Salz als Kompetitor auftritt. Außerdem bindet PJ auch an die RNA, die durch das Enzym RNase abgebaut werden kann, um um spezifische Messungen für die DNA zu ermöglichen.

2.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Abfolgen bestimmter Basenpaare in der DNA können durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) optisch markiert werden. Hierzu stellt man Sonden aus Fluorochrom-markierter DNA her, welche mit der (zu markierenden) Ziel-DNA im Zellkern hybridisiert werden, d.h. die durch Anhebung der Temperatur einzelsträngig gemachte Sonde (Denaturierung) kann sich über die komplementäre Basenpaarung spezifisch an die ebenfalls denaturierte Ziel-DNA binden (Einen Überblick der Entwicklungen geben Lichter u. Cremer 1992).

Chromosomenspezifische Sonden werden überwiegend aus cDNAs oder direkt aus der DNA des entsprechenden Chromosoms hergestellt. In beiden Fällen muß bei der Hybridisierung beachtet werden, daß ein großer Teil der DNA unspezifisch ist, d.h. gleiche Abfolgen von Nukleinsäuren auch auf anderen Chromosomen zu finden sind. Im Falle der cDNA handelt es sich bei den unspezifischen Sequenzen um die IRS (*interspersed repetitive sequences*). Werden solche Bereiche markiert, kommt es zu Signalen auch auf anderen als dem Ziel-Chromosom.

Solche unspezifischen Sequenzen werden direkt an der Sonde durch Zugabe von (nicht-markierter) Cot1-DNA nach separater Denaturierung während einer angemessenen Zeitdauer des "Auskühlens" (preannealing) abgesättigt. Diese Dauer ist ein kritischer Parameter des Verfahrens, da mit ihr auch die Wahrscheinlichkeit für die Renaturierung² spezifischer Sequenzen steigt. Zusätzlich sättigt man mit der Cot1-DNA diese Sequenzen auf dem zu markierenden Chromosom ab. Diese Vorgehensweise wird als *chromosomal in situ suppression* (CISS) Hybridisierung bezeichnet. Gesättigte Sondenfragmente binden überwiegend nicht mehr an die Ziel-DNA und werden aus dem hybridisierten Präparat herausgewaschen. Bild 2 zeigt das Schema dieser Methode.

Kommerzielle Sonden sind sowohl direkt, d.h. mit Fluorochrom versehen, als auch indirekt durch Antikörper (z.B. Biotin oder Digoxigenin), die nach der Hybridisierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen werden, markiert erhältlich. Die Chromosomensonden sind häufig bereits mit einer adäquaten Menge Cot1-DNA versehen.

² Renaturierung bedeutet hier die Wiederherstellung der Doppelsträngigkeit.

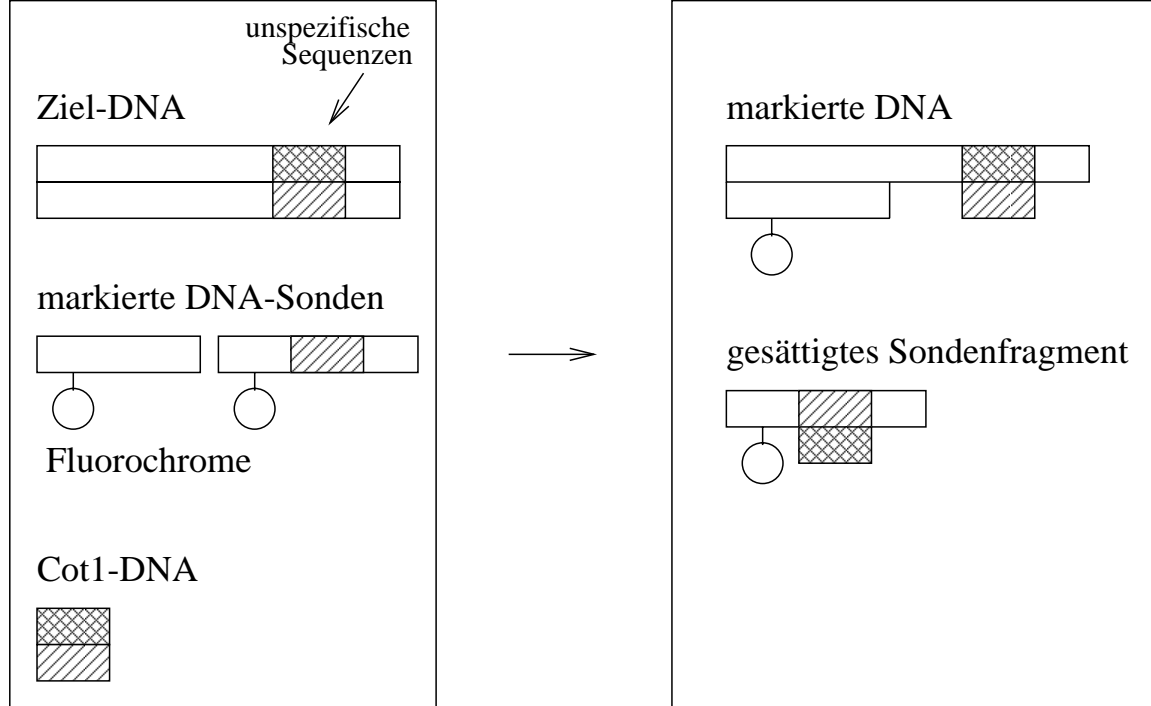


Bild 2: Oben links ist ein Ausschnitt der zu markierenden DNA gezeigt, die unspezifische Sequenzen (schraffierte Bereiche) enthält. Diese werden durch die Cot1-DNA (Unten links) sowohl an der Sonde (Mitte links) als auch an der Ziel-DNA (Oben rechts) gesättigt. Die gesättigten Sondenfragmente (Mitte rechts) werden aus dem hybridisierten Präparat herausgewaschen.

2.1.4 Die Chromosomenstruktur im Interphasekern

Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zellkerns zeigen homogene Verteilungen von Hetero- und Euchromatin im Interphasekern, so daß über die Organisation der Chromosomen in dieser Phase des Zellzyklus ohne chromosomenspezifische Markierung keine genaue Aussage getroffen werden kann. Die Annahme, daß die Chromosomen sich jeweils im gesamten Kern ausbreiten und sich gegenseitig durchdringen (Comings 1968) wurde gegen Ende der 70er Jahre experimentell falsifiziert. UV-Mikrobestrahlung³ lebender Zellen sollte nach dieser nicht-territorialen Vorstellung der Chromosomen Schäden an vielen Chromosomen erzeugen. Tatsächlich waren die Schäden, die sich als UDS⁴ (*Unscheduled DNA Synthesis*) zeigen, stets auf wenige Chromosomen begrenzt (Zorn et al. 1979). Dieses Ergebnis unterstützte die alternative Vermutung räumlich eng begrenzter Chromosomenterritorien in der Interphase (Boveri 1909). Eine Bestätigung erfuhr dieses Modell durch die Entwicklung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) (2.1.3).

Verschiedene Arbeiten, welche sich auf die FISH-Technik stützen, haben sich mit der Struktur der Chromosomendomänen beschäftigt.

Interphase-Chromosomen sind bis auf einen kleinen Eindringbereich an der Oberfläche ihrer Territorien integer (Cremer et al. 1997), d.h. sie werden nicht vom Chromatin anderer Chromosomen durchdrungen. Biophysikalische Modelle (Zirbel et al. 1993) stützen die Annahme dieser "Inter Chromosomal Domains" (ICDs) zwischen den Domänen.

Die FISH-Färbung bestimmter Bereiche auf Chromosomen, wie z.B. den Armen und R- bzw. G-Bändern⁵, zeigt, daß diese in jeder Phase des Zellzyklus ebenso integer sind (sich also untereinander nicht "mischen") wie das gesamte Chromosom (Cremer et al. 1997).

Markierungen der p- und q-Arme⁶ vom humanen Chromosom 1 mit unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen legen zudem eine Erhaltung der räumlichen Relationen dieser Bereiche zueinander nahe (Boei et al. 1998).

³ Bestrahlung eines kleinen (bezüglich des gesamten Zellkerns) Volumens

⁴ Diese Außerplanmäßige DNA-Synthese ist Teil des Reparatur-Prozesses.

⁵ R- und G-Bänder sind früh bzw. spät replizierende Bereiche auf den Chromosomen. Man kann sie detektieren, indem man der Zelle zu verschiedenen Zeiten der S-Phase Fluorochrom-markierte Nukleotide (Uridin-Derivate) anbietet

⁶ Als p- und q-Arm eines Chromosoms bezeichnet man den kürzeren bzw. längeren Abschnitt längs seiner Chromatiden

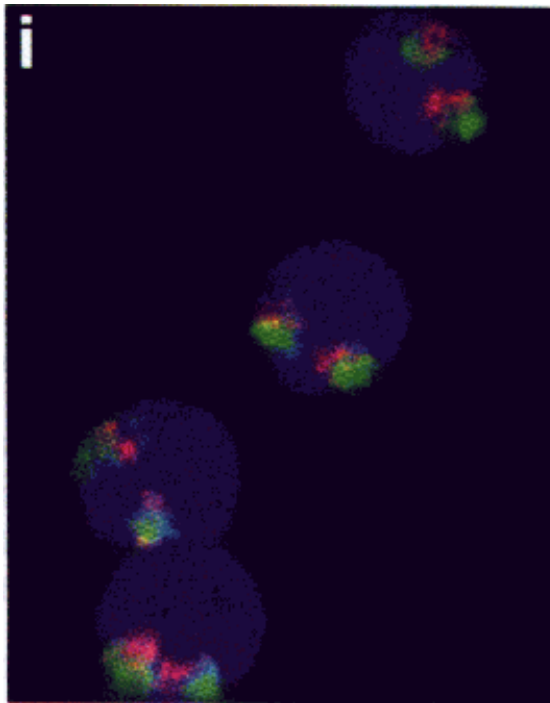


Bild 3: Die p- und q-Arme humaner Interphase-Lymphozyten sind zweifarbig markiert. Man erkennt, daß sie voneinander verschiedene Territorien einnehmen (Aus: Boei et al. 1998).

2.2 Physikalische Grundlagen

2.2.1 Das konfokale Laserscanning-Mikroskop

2.2.1.1 Mechanischer Aufbau und strahlenoptisches Prinzip

Räumliche Messungen schwach absorbierender Objekte⁷ können gewonnen werden, indem Bildaufnahmen in unterschiedlichen Tiefen dieser fluoreszenzmarkierten Objekte gemacht und miteinander verknüpft werden. Die axiale Bildposition ist hierbei die dritte Dimension im Koordinatensystem. Aus diesem Grunde spricht man von den gewonnenen Meßdaten als “Bildstapel”.

Diese Technik ist für die Differenzkontrast-Mikroskopie (Munster 1997) beschrieben worden und findet im Reflektionsmodus von Auflichtmikroskopen (Wilson 1990) ebenso Verwendung wie in der Fluoreszenzmikroskopie, um die es in dieser Arbeit geht.

Das konfokale Laserscanning-Mikroskop (CLSM) ist für diese Applikationen besonders gut geeignet, da es bei jeder Aufnahme eines Schichtbildes Bildinformationen aus darüber- bzw. darunterliegenden Ebenen unterdrückt. Zudem zeichnet es sich auch durch eine schmalere laterale Verbreiterung der Punktlichtantwort aus. Dies führt zu einer verbesserten optischen Auflösung, also zu einem “schärferen” Bild.

Das CLSM ist ein Punktlicht-Scanner, der für jede Einzelmessung eines Bildpunktes ein kleines Volumen beleuchtet und detektiert. Lochblenden (Pinholes) in der fokalen Objekt- bzw. Bildebene begrenzen die Beleuchtung und den Detektor. Diese Begrenzung wirkt sich nicht nur auf die laterale Bildnachbarschaft aus. Lichtsignale außerhalb der fokalen Ebene tragen zur Unschärfe und Verbreiterung des Lichtes in der Abbildungsebene aus. Das begrenzende Detektions-Pinhole blendet nun einen großen Teil dieses störenden Lichtes aus. Bild 4 zeigt den prinzipiellen mechanischen Aufbau eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops.

Ein Spiegelsystem, das auf dem Einsatz von Galvanometern beruht und zwischen dem Objektiv und dem dichroistischen Spiegel angeordnet ist, führt den Lichtpunkt (Die Beleuchtung und damit auch das gemessene Licht) über das zu rasternde Gebiet. Um Aufnahmen aus unterschiedlichen Tiefen zu gewinnen, wird der Mikroskoptisch herauf- bzw. heruntergefahren.

⁷ Humane Lymphozyten absorbieren so wenig Licht, daß sie im Durchlichtmikroskop nicht zu sehen sind.

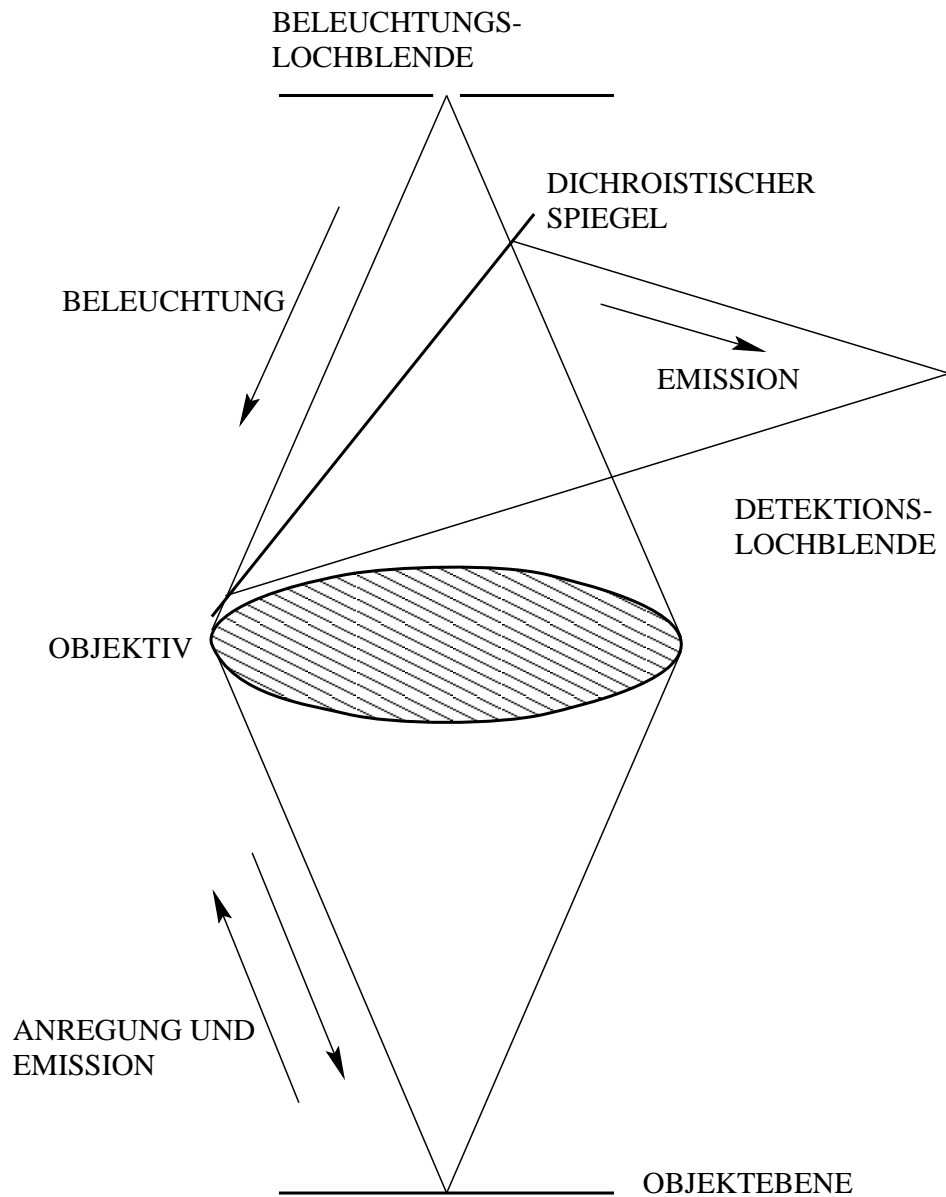


Bild 4: Lochblenden (Pinholes) begrenzen die Lichtkegel im konfokalen Laserscanning-Mikroskop, in welchem das Objekt mit einem kleinen Lichtpunkt abgerastert wird. Das dargestellte Schema zeigt einen Aufbau, bei dem die Beleuchtung und das vom Objekt emittierte Licht durch das gleiche Objektiv fokussiert werden. In diesem Fall muß das zu detektierende Lichtsignal jedoch mit einem dichroistischen Strahlteiler aus dem Strahlengang der Anregung herausgefiltert werden.

2.2.1.2 Die Punktverwaschungsfunktion im CLSM

Die Wahrscheinlichkeit für das Antreffen eines Photons außerhalb des Beleuchtungskegels ist größer Null, d.h. nach Vorstellung der Optik sorgt die Beugungsbegrenztheit des CLSM für eine Limitierung der Ortsauflösung. Gleiches ist auch für den physikalischen Prozeß der Detektion gültig. Auch hier werden mit von Null verschiedener Wahrscheinlichkeit Photonen gemessen, die nicht exakt dem Ort des Brennpunktes zugeordnet werden können. Die Punktverwaschungsfunktion (PSF, Point Spread Function) h gibt mit $I = |h|^2$ die Intensität der Verbreiterung an. Nach Wilson (1990) gilt für Anregungslicht und Emission

$$h(u, v) = 2 \int_0^1 P(\rho) e^{\frac{1}{2} i u \rho^2} J_0(v \rho) \rho d\rho, \quad (2.1)$$

wobei $P(\rho)$ die Ausdehnung und Transmissivität des Linsensystems beschreibt. ρ ist auf den Durchmesser der Linse normiert und $P(\rho) = 0$ für $\rho \geq 1$. Die Abhängigkeit von der Wellenlänge und der numerischen Apertur der Optik schlägt sich in den optischen Koordinaten

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) \quad (2.2)$$

und

$$v = \frac{2\pi}{\lambda} r \sin(\alpha) \quad (2.3)$$

nieder, wobei $\sin(\alpha)$ die numerische Apertur ist.

(2.1) gilt aufgrund des konfokalen Prinzips für Anregung (h_{ex}) und Emission (h_{em}) und die Gesamtintensität s ergibt sich als Produkt der Einzelintensitäten zu

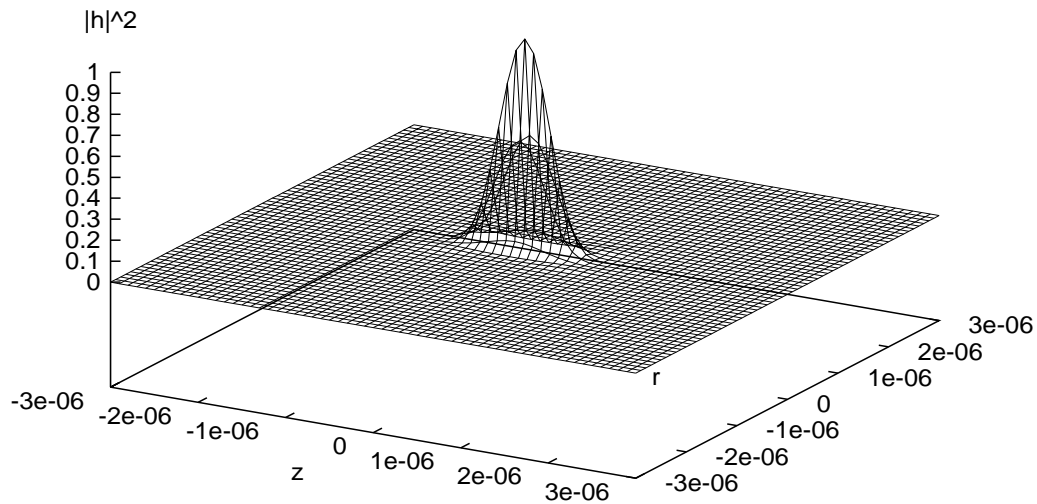
$$s(u, v) = |h_{ex}(u, v) h_{em}(u, v)|^2. \quad (2.4)$$

Bild 5 stellt die Intensitäten der PSF für das konfokale Mikroskop und für ein konventionelles Mikroskop gegenüber. Aufgezeichnet ist die Intensitätsverteilung als Resultat einer Lichtquelle mit der Charakteristik des FITC-Farbstoffes (*Fluoreszeinisothiozyanat*). Die Koordinaten sind metrisch ($[\mathbf{m}]$) angegeben

Aus Gründen der Energieerhaltung wird $s(u, v)$ mit $v(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{x^2 + y^2} \sin(\alpha)$ und $u = u(z)$ zu $s(x, y, z)$ normiert, so daß

$$\int \int \int_{-\infty}^{+\infty} s(x, y, z) dx dy dz = 1, \quad (2.5)$$

d.h. daß das Integral über die Wahrscheinlichkeitsdichte 1 ergeben muß.



PSF eines einfachen Scanners

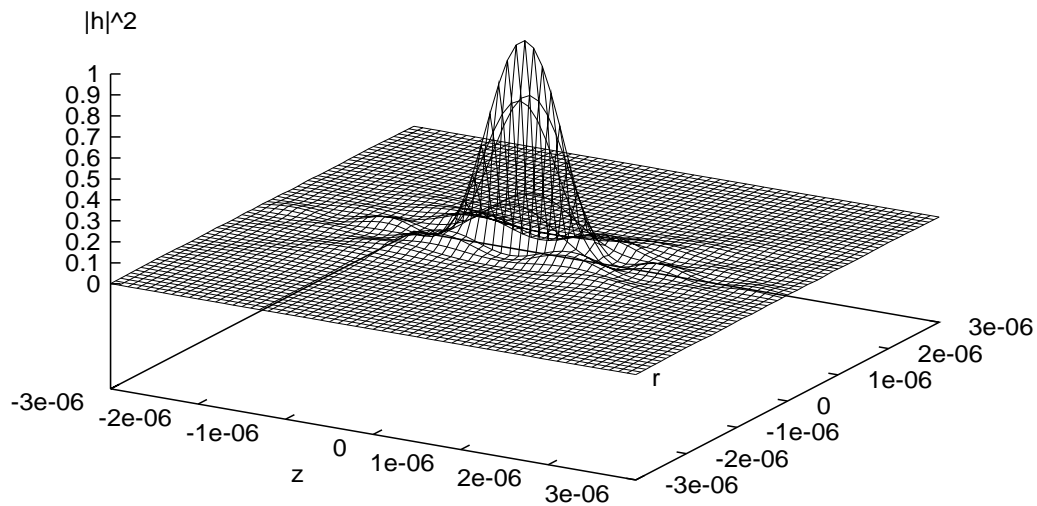


Bild 5: Die PSF von konfokalem und nichtkonfokalem Scanner sind in Abhängigkeit von der lateralen und der axialen Koordinate (z) dargestellt. Wegen der Symmetrie der PSF ist für die laterale Koordinate nur r aufgetragen.

2.2.1.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Da die Fluoreszenz der abzubildenden Objekte eine inkohärente Beleuchtung darstellt, kann die Abbildung i des Objektes o (i und o sind Intensitätsverteilungen) als Faltung

$$i(x, y, z) = \int \int \int_{-\infty}^{+\infty} s(x', y', z') o(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz' , \quad (2.6)$$

bzw

$$i = s \otimes o \quad (2.7)$$

geschrieben werden. Mit der Fourier-Transformation \mathcal{F} und $I = \mathcal{F}(i)$, $S = \mathcal{F}(s)$ sowie $O = \mathcal{F}(o)$ wird hieraus das Produkt

$$I = S O. \quad (2.8)$$

2.2.2 Simulation der Lichtstreuung

Die Lichtstreuung ist in biologischen Systemen ein experimentell schwer zu quantifizierender Effekt. Computersimulationen erlauben es, eine Abschätzung zu treffen (Dunn 1997).

2.2.2.1 Die Maxwellschen Gleichungen

Die Elektrodynamik beschreibt Licht als eine elektromagnetische Welle, deren magnetisches (**H**) und elektrisches Feld (**E**) (in Abwesenheit seiner Quellen) den folgenden Maxwell-Gleichungen genügt:

$$\operatorname{rot} \mathbf{E} = -\dot{\mathbf{B}} \quad (2.9)$$

$$\operatorname{rot} \mathbf{H} = \dot{\mathbf{D}} \quad (2.10)$$

mit

$$\mathbf{B} = \mu \mathbf{H} \quad (2.11)$$

$$\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E} \quad (2.12)$$

und

$$\mu = \mu_0 \mu_r \quad (2.13)$$

$$\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r. \quad (2.14)$$

B und D bezeichnen die magnetische Induktion bzw. die elektrische Verschiebung. μ_r und ϵ_r sind *materialabhängige* Konstanten und stehen in folgender Weise mit der optischen Dichte n eines Mediums in Zusammenhang:

$$n = \sqrt{\mu_r \epsilon_r}. \quad (2.15)$$

Da n in biologischen Medien typischerweise variiert, sind (2.9) und (2.10) nicht mehr ohne Beschränkung der Allgemeinheit lösbar.

2.2.2.2 Die numerische Lösung der Maxwell-Gleichungen

Yee hat auf die Möglichkeit hingewiesen, diese Gleichungen numerisch zu lösen (1966). Für das Vektorprodukt von Differentialoperator und Feld werden Differenzenquotienten $\frac{f(x+1)-f(x-1)}{2\Delta x}$ verwendet, deren Schrittweite Δx durch den Gitterabstand des Modells gegeben ist.

Die Integration geschieht im einfachsten Falle durch das Euler-Cauchysche Verfahren

$$\mathbf{f}_{t+1} = \mathbf{f}_t + \Delta t \mathbf{g}(\mathbf{f}_t). \quad (2.16)$$

\mathbf{f} repräsentiert als sechsdimensionaler Vektor das EM-Feld

$$\mathbf{f} = \begin{pmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \\ E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}. \quad (2.17)$$

In Komponentenschreibweise lautet die Vorschrift für die numerische Integration der ersten diskretisierten Maxwellschen Gleichung (2.9) dann wie folgt:

$$\begin{aligned} H_x^{t+1}(i, j, k) &= H_x^t(i, j, k) \\ &- \frac{\Delta t}{\mu} \left(\frac{E_z^t(i, j+1, k) - E_z^t(i, j-1, k)}{2\Delta x} - \frac{E_y^t(i, j, k+1) - E_y^t(i, j, k-1)}{2\Delta x} \right) \end{aligned} \quad (2.18)$$

$$\begin{aligned} H_y^{t+1}(i, j, k) &= H_y^t(i, j, k) \\ &- \frac{\Delta t}{\mu} \left(\frac{E_x^t(i, j, k+1) - E_x^t(i, j, k-1)}{2\Delta x} - \frac{E_z^t(i+1, j, k) - E_z^t(i-1, j, k)}{2\Delta x} \right) \end{aligned} \quad (2.19)$$

$$\begin{aligned} H_z^{t+1}(i, j, k) &= H_z^t(i, j, k) \\ &- \frac{\Delta t}{\mu} \left(\frac{E_y^t(i+1, j, k) - E_y^t(i-1, j, k)}{2\Delta x} - \frac{E_x^t(i, j+1, k) - E_x^t(i, j-1, k)}{2\Delta x} \right). \end{aligned} \quad (2.20)$$

Gleichung (2.10) kann analog behandelt werden:

$$\begin{aligned} E_x^{t+1}(i, j, k) &= E_x^t(i, j, k) \\ &+ \frac{\Delta t}{\epsilon} \left(\frac{H_z^t(i, j+1, k) - H_z^t(i, j-1, k)}{2\Delta x} - \frac{H_y^t(i, j, k+1) - H_y^t(i, j, k-1)}{2\Delta x} \right) \end{aligned} \quad (2.21)$$

$$\begin{aligned} E_y^{t+1}(i, j, k) &= E_y^t(i, j, k) \\ &+ \frac{\Delta t}{\epsilon} \left(\frac{H_x^t(i, j, k+1) - H_x^t(i, j, k-1)}{2\Delta x} - \frac{H_z^t(i+1, j, k) - H_z^t(i-1, j, k)}{2\Delta x} \right) \end{aligned} \quad (2.22)$$

$$E_z^{t+1}(i, j, k) = E_z^t(i, j, k) + \frac{\Delta t}{\epsilon} \left(\frac{H_y^t(i+1, j, k) - H_y^t(i-1, j, k)}{2\Delta x} - \frac{H_x^t(i, j+1, k) - H_x^t(i, j-1, k)}{2\Delta x} \right) \quad (2.23)$$

i, j, k bezeichnen die Ortskoordinaten.

2.2.2.3 Der Hertzsche Dipol

Als Anfangsbedingung für die Berechnung der Lichtausbreitung dient der Hertzsche Dipol (Bild 6), dessen Lösungen bekannt sind. Das \mathbf{E} -Feld am Ort \mathbf{r} liegt parallel zur Ebene, die durch die Achse des Dipols r' sowie dem Vektor, der von der ruhenden Ladung nach \mathbf{r} zeigt und einen Winkel ϕ mit der Achse einschließt, aufgespannt wird. Das \mathbf{B} -Feld steht senkrecht auf ihr. Die Beträge der Felder gehen im wesentlichen mit $\frac{\sin \phi}{|\mathbf{r}|}$. Der winkelabhängige Term sorgt an den Polen für verschwindende Felder und hebt somit die Kugelsymmetrie auf.

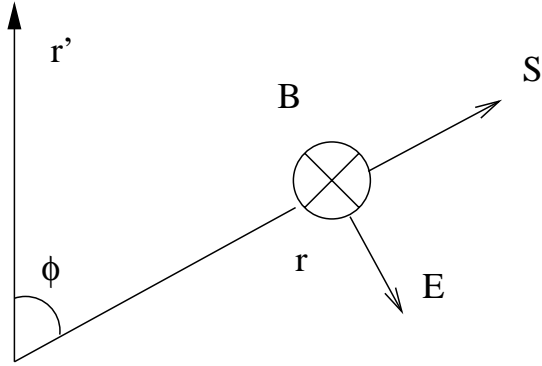


Bild 6: Die Richtungen der Felder und des Poynting-Vektors $\mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{B}$.

Wir haben die Beträge (Weller u. Winkler 1979)

$$E = \frac{\mu_0 \omega^2}{4\pi r} p_0 \sin \phi \cos kr - \omega t \quad (2.24)$$

und

$$B = \frac{1}{c} E \quad (2.25)$$

mit p_0 dem Dipolmoment.

2.2.3 Bildverarbeitung

2.2.3.1 Rauschfilter

2.2.3.1.1 Zeitlich gemittelte Messungen

Ergodisches Rauschen in Bildern zeichnet sich dadurch aus, daß die fouriertransformierte Funktion des Rauschens sowohl in allen Raumrichtungen, als auch in der Zeit ein konstantes Amplitudenspektrum aufweist. Zusammen mit der Annahme normalverteilter Grauwerte im Rauschbild kann eine Messung durch zeitliche Mittelwertbildung verbessert, d.h. in Richtung des Zentrums der Verteilung korrigiert werden. Dieser wird für N sukzessive Messungen I_t geschätzt als

$$[I] = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^N I_t . \quad (2.26)$$

2.2.3.1.2 Räumliche gemittelte Messungen

In (2.2.1.2) ist bereits die räumliche Verbreiterung des Lichtes durch die PSF angesprochen worden. Sofern Bilder mit einer Auflösung (Pixel/Länge, $[1/m]$) aufgezeichnet werden, die sehr viel größer als die Wellenzahl $\frac{1}{\lambda}$ ist, folgt daraus eine geringe Varianz der Grauwerte in lokalen Nachbarschaften. Für eine solche lokale Nachbarschaft nimmt man nun einen konstanten Grauwert an. Der Fehler, den man mit dieser Annahme macht, wird gering sein, wenn das normalverteilte Rauschen zu stärkeren Varianzen als die reale Bildinformation führt. Die Mittelwertbildung über alle N Pixel oder Voxel einer lokalen Nachbarschaft L wird nun wieder den Erwartungswert 0 des Rauschens beinhalten und den angenommenen, lokal konstanten Wert I abschätzen, also

$$[I] = \frac{1}{N} \sum_{\mathbf{x} \in L} I(\mathbf{x}) . \quad (2.27)$$

2.2.3.1.3 Tiefpaßfilter

Häufig werden Tiefpaßfilter, z.B. mit der Charakteristik der Gaußfunktion $s(\mathbf{x}) = e^{-\sigma \mathbf{x}^2}$, eingesetzt, um die großen Gradienten des Rauschens zu beseitigen, also

$$[I] = S \otimes I . \quad (2.28)$$

S ist wieder die fouriertransformierte Funktion s .

2.2.3.1.4 Räumliche und zeitliche Median-Filterungen

Das nichtlineare Medianfilter sortiert die Grauwerte einer Nachbarschaft von N Bildelementen nach ihrer Größe und liefert den Wert an der Position $\frac{N}{2}$ in der sortierten Liste zurück. Im Gegensatz zur Mittelwertbildung verändern “Ausreißer”, d.h. stark abweichende Grauwerte, nicht das Resultat. Damit eignet sich das Median-Filter auch zur Filterung von nicht-normalverteiltem Rauschen.

Weiterhin sind nur Grauwerte im Filtrat zu finden, die tatsächlich gemessen werden. Das ist von Interesse in Systemen, deren physikalisch sinnvolle Zustände nur diskrete Werte annehmen können.

Das Medianfilter ist nicht nur auf eine räumliche, sondern auch auf eine zeitliche Nachbarschaft, d.h. auf sukzessive Messungen desselben Volumens, anwendbar.

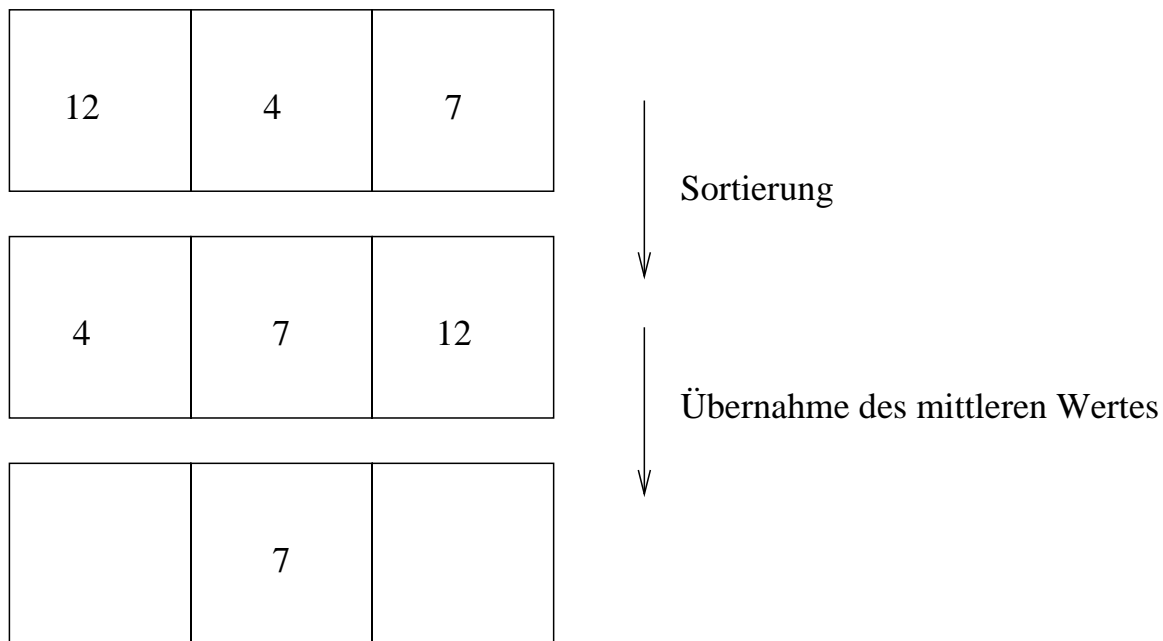


Bild 7: Die drei benachbarten Grauwerte der oberen Zeile werden in diesem eindimensionalen Beispiel sortiert, der mittlere Wert in der Liste (nicht der Mittelwert) wird dann in die untere Zeile eingetragen.

2.2.3.1.5 Das nichtlineare anisotrope Diffusionsfilter

Nichtlineare anisotrope Diffusionsfilter sind iterative Rauschfilter, die Kantenstrukturen sehr gut erhalten können. Perona u. Malik (1990) formulieren ein Filter anhand der Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} I(\mathbf{x}, t) = \nabla \cdot [c(\mathbf{x}, t) \nabla I(\mathbf{x}, t)] , \quad (2.29)$$

wobei t als Iterationsschritt interpretiert wird und c eine monoton fallende Diffusionsfunktion ist, die vom Betrag der Grauwertgradienten im Bild abhängt:

$$c(\mathbf{x}, t) = f(|\nabla I(\mathbf{x}, t)|) . \quad (2.30)$$

Hierdurch wird eine Justierung der Diffusionsstärke erreicht, die z.B. von Kanten im Bild abhängig sein kann. Die Exponentialfunktion

$$c(\mathbf{x}, t) = e^{- \left(\frac{|\nabla I(\mathbf{x}, t)|}{\kappa} \right)^2}$$

ist eine mögliche Wahl.

Die Diffusions-Konstante κ sollte so eingestellt sein, daß mit \mathbf{y} der Position einer relevanten Kante im Bild gilt:

$$\kappa \leq |\nabla I(\mathbf{y}, 0)| . \quad (2.31)$$

Die für die dreidimensionale Bildverarbeitung notwendige diskrete Formulierung sieht mit dem Euler-Verfahren wie folgt aus:

$$\begin{aligned} I(x_1, x_2, x_3, t + \Delta t) &\simeq I(x_1, x_2, x_3, t) + \frac{\Delta t}{(\Delta x_1)^2} \\ &\left[c(x_1 + \Delta x_1, x_2, x_3, t) [I(x_1 + 2\Delta x_1, x_2, x_3, t) - I(x_1, x_2, x_3, t)] \right. \\ &\quad \left. - c(x_1 - \Delta x_1, x_2, x_3, t) [I(x_1, x_1, x_2, x_3, t) - I(x_1 - 2\Delta x_1, x_2, x_3, t)] \right] \\ &+ \dots \end{aligned} \quad (2.32)$$

Aus Gründen der Übersicht ist hier nur der erste Term des Divergenz-Operators angegeben. Die diskreten Ableitungen von $c\nabla I$ nach x_2 und x_3 sind von analoger Gestalt.

2.2.3.2 Restauration

2.2.3.2.1 Das Inverse Filter

Gleichung (2.8) legt nahe, die Verbreiterung der Bildinformation durch die PSF mittels Invertierung aus dem Bild herauszurechnen, also

$$O = \frac{I}{S}. \quad (2.33)$$

Dieses Vorgehen birgt einige Probleme. Zum einen ist weder i noch eine experimentell bestimmte PSF s über einen unendlich ausgedehnten Raum bekannt und die Beugungsbegrenztheit des optischen Systems sorgt überdies für Nullstellen in S , so daß die Inverse nur in einem endlichen Intervall definiert ist. Zum anderen wird in der Regel additives Rauschen n die Bildinformation mit

$$i = s \otimes o + n \quad (2.34)$$

verfälschen.

2.2.3.2.2 Das Wiener Filter

n ist in der Regel ergodisch, d.h. sein Amplitudenspektrum Φ_n ist konstant. Über das Spektrum von o (Φ_o) kann man eine Abschätzung machen, indem man das Rauschen durch Tiefpaßfilterung entfernt. Aus diesen Informationen kann das *Optimale Filter* (Goodman 1968)

$$H = \frac{S^*}{|S|^2 + \frac{\Phi_n}{\Phi_o}} \quad (2.35)$$

generiert werden, so daß

$$O \approx H I. \quad (2.36)$$

2.2.3.2.3 Das Tikhonov-Miller Filter

Das inverse Signal/Rausch Verhältnis im Wiener Filter kann ersetzt werden durch $\eta = (\frac{\epsilon}{\epsilon})^2$ mit

$$\|i - s \otimes \hat{o}\| \leq \epsilon, \quad (2.37)$$

wobei ϵ eine Abschätzung über die euklidische Norm des Rauschens und \hat{o} eine Abschätzung von o ist und

$$\|c \otimes \hat{o}\| \leq \epsilon, \quad (2.38)$$

wobei ϵ ein Grenzwert für die Energie und c einen Regularisierungsoperator darstellt, um zur Formulierung des Tikhonov-Miller Filters zu gelangen:

$$T = \frac{S^*}{|S|^2 + \eta \|C\|^2}. \quad (2.39)$$

C ist die Fouriertransformierte des Regularisierungsoperators c , der ohne a priori Informationen zu $\delta(\mathbf{r})$ gewählt wird. Im Gegensatz zum Wiener Filter ist der additive Term im Nenner somit konstant.

2.2.3.2.4 Der ICTM Algorithmus

Eine stabile Abschätzung für \hat{o} wird durch Minimierung des Funktionals

$$\Phi(\hat{o}) = \frac{1}{2}(\|s \otimes \hat{o} - i\|^2 + \eta\|c \otimes \hat{o}\|^2) \quad (2.40)$$

gewonnen (Tikhonov u. Arsenin 1977). Ohne Zwangsbedingungen ist das Problem linear und seine Lösung ist Gleichung (2.39).

Wenn die Bedingung $\hat{o} \geq 0$ eingeführt wird, muß das Problem iterativ gelöst werden (Lagendijk 1990). Der Algorithmus hierzu wird als “Iterative Constrained Tikhonov-Miller” (ICTM) bezeichnet.

Der Gradient von (2.40) ist

$$\nabla\Phi(\hat{o}) = A\hat{o} - s^T \otimes i \quad (2.41)$$

mit

$$A = |s|^2 + \eta\|c\|^2. \quad (2.42)$$

Die Iteration lautet

$$\hat{o}^{k+1} = P(\hat{o}^k + \alpha^k d^k). \quad (2.43)$$

P ist der Projektionsoperator

$$P(o_i) = \begin{cases} o_i & \text{wenn } o_i > 0, \\ 0 & \text{sonst,} \end{cases} \quad (2.44)$$

d gibt mit

$$d^k = \nabla\phi(\hat{o}^k) + d^{k-1} \frac{\|\nabla\phi(\hat{o}^k)\|^2}{\|\nabla\phi(\hat{o}^{k-1})\|^2} \quad (2.45)$$

die Suchrichtung an (Press et al. 1992).

Die Schrittweite α berechnet sich durch den Gold- oder den Brent-Algorithmus (Press et al. 1992).

2.2.3.3 Mathematische Morphologie

2.2.3.3.1 Die Grundoperatoren

Die Mathematische Morphologie (Serra 1982) formuliert die Operatoren \mathcal{E}_G (Erosion) und \mathcal{D}_G (Dilatation), die im folgenden definiert werden.

Allgemeine Definitionen

Es sei $F(\mathbf{x})$ der Wert einer “Bild-Funktion” an der Stelle $\mathbf{x} \in D_F$, $G(\mathbf{x})$ der Wert eines “Strukturelementes” an der Stelle $\mathbf{x} \in D_G$ und $G(\mathbf{0})$ sein “zentrales Element”. Gesucht werden nun Funktionen $O_i(\mathbf{x})$ für die gelten:

$$\forall \mathbf{y} \in D_F \cap D_G \text{ mit } F(\mathbf{y}) = G(\mathbf{y} - \mathbf{x}) + O_i(\mathbf{x}) : F'(\mathbf{y}) = G'(\mathbf{y} - \mathbf{x}) . \quad (2.46)$$

Es existieren maximal zwei Lösungen O_1 und O_2 . Im Falle ihrer Existenz können durch die Bedingung, daß alle Berührungspunkte zwischen $F(\mathbf{y})$ und $G(\mathbf{y} - \mathbf{x}) - O_i(\mathbf{x})$ Tangenten sind, die folgenden Fälle auftreten: $F(\mathbf{y}) \geq G(\mathbf{y} - \mathbf{x}) + O_2(\mathbf{x})$ und $F(\mathbf{y}) \leq G(\mathbf{y} - \mathbf{x}) + O_1(\mathbf{y})$.

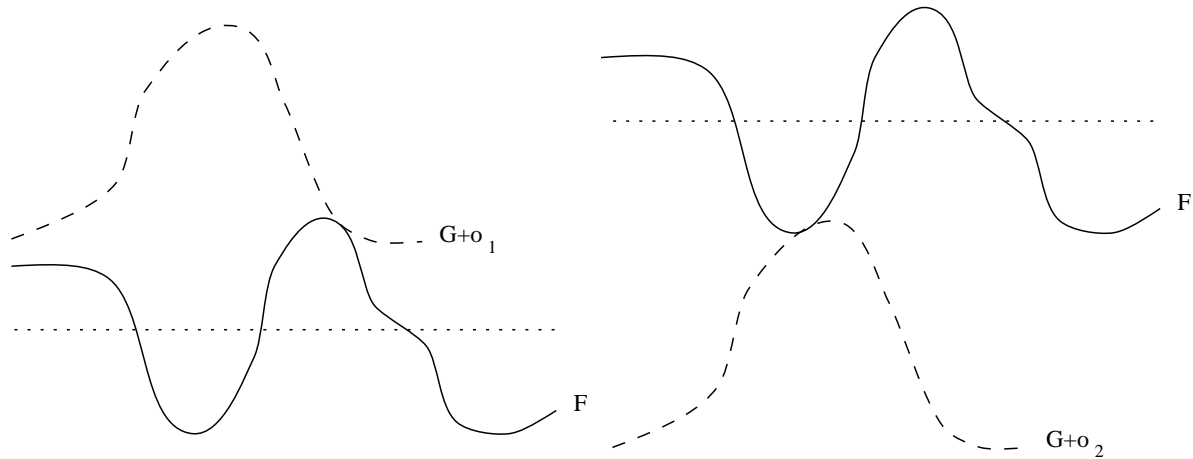


Bild 8: Die Graphen zweier Funktionen F und $G + o_i$ sind für die beiden Lösungen o_1 und o_2 von (2.46) aufgezeichnet.

Die Operator-Gleichungen lauten nun:

Erosion:

$$\mathcal{E}_G F(\mathbf{x}) = G(\mathbf{0}) + O_2(\mathbf{x}) . \quad (2.47)$$

Dilatation:

$$\mathcal{D}_G F(\mathbf{x}) = G(\mathbf{0}) + O_1(\mathbf{x}) . \quad (2.48)$$

Anschaulich bedeuten die Operatoren folgendes: Das Strukturelement wird so über das Bild geführt, daß es sich entweder von “oben” (Dilatation) oder von “unten” (Erosion) an dieses anschmiegt (Bild 8). Dabei liefert die Summe aus der Intensität des zentralen Elementes und der notwendigen “Anhebung” bzw. “Absenkung” des Strukturelementes das Ergebnis der jeweiligen Operation.

Die Erosion und die Dilatation sind lineare Operatoren, d.h.

$$\mathcal{E}_G^n F(\mathbf{x}) = \mathcal{E}_G F(n\mathbf{x}) \quad (2.49)$$

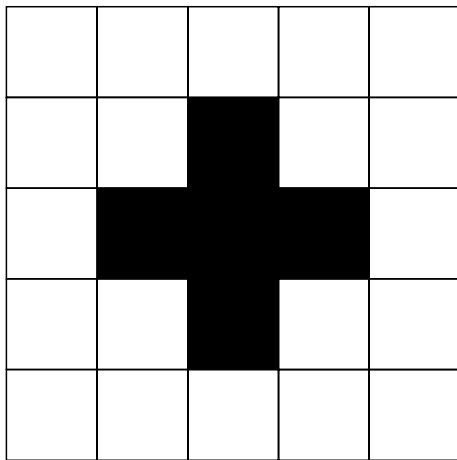
und

$$\mathcal{D}_G^n F(\mathbf{x}) = \mathcal{D}_G F(n\mathbf{x}) \quad (2.50)$$

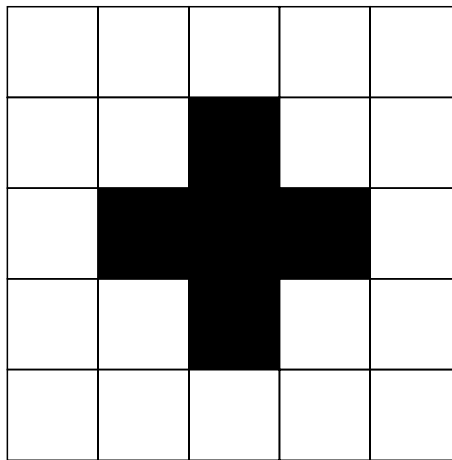
Man sieht dies so: Die n -fache Anwendung der Operatoren entspricht der einfachen Anwendung auf eine durch n gestauchte Funktion. Das ist äquivalent zur Anwendung mit einem gestreckten Strukturelement.

Häufig werden diese Operatoren mit binären, zweidimensionalen Strukturelementen auf binäre und ebenfalls zweidimensionale Funktionen angewandt, also $F, G \subset \{0, 1\}$. Diese Applikation liefert eine eingängliche Anschauung der Funktionsweise der Operatoren. Für jedes Pixel \mathbf{x} eines Bildes legt man das Strukturelement so über jenes, daß das zentrale Element ebenfalls an der Stelle \mathbf{x} liegt. Das betreffende Pixel wird nun im Falle der Erosion gelöscht, wenn es ein oder mehrere Pixel mit dem Wert 0 im Bild gibt, so daß die korrespondierenden Pixel im Strukturelement wenigstens einmal einen Wert 1 annehmen. Der Dilatations-Operator setzt demgegenüber das betrachtete Pixel im Bild, wenn es in einem oder mehreren Pixeln in der Überdeckung von Bild und Strukturelement zur Übereinstimmung kommt, so daß die korrespondierenden Pixel den Wert 1 annehmen.

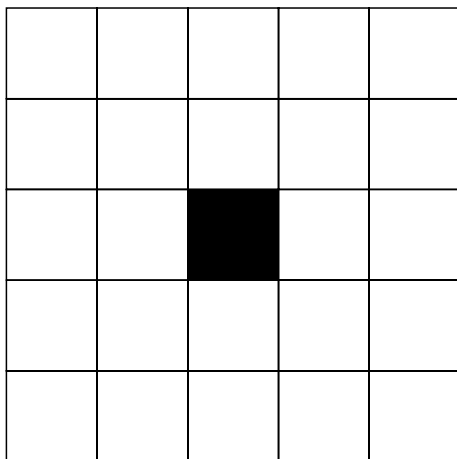
Bild 9 demonstriert diese binären Operationen an zweidimensionalen Bildern.



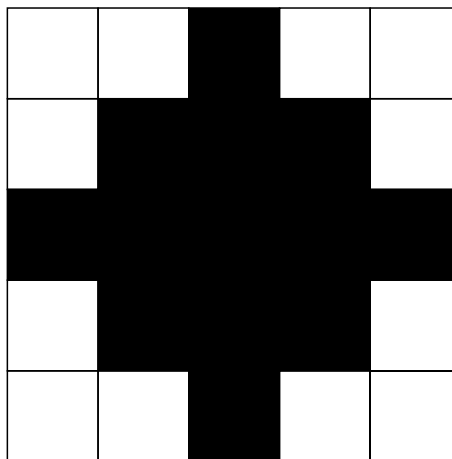
Strukturelement



Bild



Erosion



Dilatation

Bild 9: Sind Strukturelement und Bild identisch, so besteht das Resultat der binären Erosion stets aus einem einzelnen Pixel, da es nur eine vollständige Überdeckung gibt. Das Ergebnis der Dilatation läßt die vier "Ecken" auf dem ursprünglichen Wert 0, da es nur hier zu keiner Überdeckung kommt. Man sieht es in diesem einfachen Fall den Resultaten an, daß das zentrale Element genau in der Mitte des Strukturelementes liegt.

2.2.3.3.2 Opening und Closing

Anschaulich bewirken die Grundoperatoren der Mathematischen Morphologie bei Binärbildern ein Auffüllen von “Löchern” (Dilatation), bzw. die Erweiterung solcher “Löcher” (Erosion) im Bild. Insbesondere die Größe der Bildelemente wird dabei erhöht bzw. verringert. Um diesen Effekt zu kompensieren, kann man beide Grundoperatoren miteinander verknüpfen.

Definiert sind das Closing

$$\mathcal{C}_G F = \mathcal{E}_G(\mathcal{D}_G F) \quad (2.51)$$

und das Opening

$$\mathcal{O}_G F = \mathcal{D}_G(\mathcal{E}_G F), \quad (2.52)$$

deren Effekte in Bild 10 zu sehen sind.

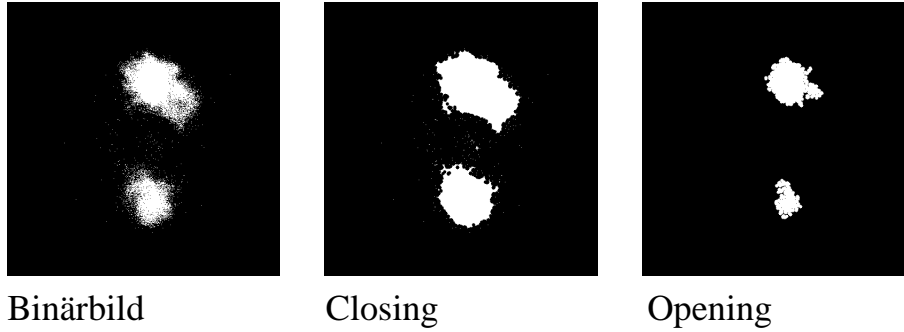


Bild 10: Von links nach rechts ist ein binäres Schnittbild zweier Chromosomendomänen, das Resultat des Closing-Operators sowie das Resultat des Opening-Operators, angewandt auf dieses Schnittbild, zu sehen. Als Strukturelement findet eine runde Scheibe mit dem Radius 3 Verwendung. Das Closing liefert eine geschlossene Fläche im gesamten Bereich des Domänen-Schnittes, während das Opening lediglich die zuvor bereits geschlossenen Bereiche erhält und alles andere entfernt.

Insbesondere dem Closing-Operator kommt in dieser Arbeit eine wichtige Bedeutung zu. Die meisten verwendeten Segmentierer (2.2.3.4) können innerhalb der Chromosomendomänen “Löcher” hinterlassen. Diese werden durch niedrige Grauwerte verursacht, die jedoch aufgrund der zu erwartenden Integrität dennoch der Domäne angehören (2.1.4 f). Das Closing kann diese Löcher in den Binärbildern, die daraufhin als Maske für die Grauwertbilder dienen, nun schließen.

2.2.3.4 Metrik

Die Aufnahme von Meßdaten mit dem Laserscanner ist zweifach quantisiert: Die Abtastung des Zielobjektes erfolgt diskret in allen Raumrichtungen, wobei an den Stützstellen, auch *Voxel*⁸ genannt, digitalisierte Meßwerte verzeichnet sind. In der Repräsentation des Erfassungssystems ist jeder Wert in einem Kubus lokalisiert und für die Metrik gilt die Manhattan-Norm⁹, also

$$d_m(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \sum_{i=1}^3 |x_i - y_i|. \quad (2.53)$$

Alternativ kann man die Annahme machen, der Meßwert sei *zentral* im Kubus lokalisiert und nimmt einen infinitesimalen Raumbereich ein¹⁰. In diesem Falle lassen sich die Abstände zwischen den Stützstellen linear interpolieren und nach der Euklidischen Metrik

$$d_e(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \sqrt{\sum_{i=1}^3 (x_i - y_i)^2}. \quad (2.54)$$

berechnen.

2.2.3.5 Nachbarschaft

Als n -Nachbarschaft eines Voxels \mathbf{x} bezeichnen wir hier diejenigen Voxel \mathbf{y} , für die gilt: $d_m(\mathbf{x}, \mathbf{y}) \leq n$. Für $n = 1$ besteht die Nachbarschaft aus Voxel, deren Seitenflächen sich berühren, für $n = 2$ kommt zusätzlich die “Kantennachbarschaft” hinzu und für $n = 3$ noch die sich an den Eckpunkten tangierenden Voxel.

Üblicherweise verwendet man eine andere Notation, die sich aus der Anzahl der Nachbarpunkte definiert. Diese ist aber in drei Dimensionen wenig intuitiv.

2.2.3.6 Segmentierung

Die Segmentierung digitaler Bilder dient dazu, “interessante” Bildregionen vom “Hintergrund” zu trennen. Im folgenden werden, nach wenigen allgemeinen Definitionen, verschiedene Segmentiervverfahren und Methoden zu deren Parametrisierung vorgestellt. Nach Zhang (1997) lassen sich diese in vier Gruppen einteilen:

⁸ Abk.: “volume elements”

⁹ auch 1-Norm genannt

¹⁰ Bei Bestimmung der Dichte muß diese Delta-Funktion natürlich wie üblich als approximierte Funktion über einen finiten Raumbereich integriert werden

Technik:	Parallele Strategie	Sequentielle Strategie
Grenzbezogen	Gruppe 1 (G1)	Gruppe 2 (G2)
Regionsbezogen	Gruppe 3 (G3)	Gruppe 4 (G4)

Tabelle 1: Zhang (1997) teilt die Segmentier-Algorithmen in vier Gruppen auf.

Grenzbezogene Segmentierer definieren den zu segmentierenden Bildbereich über seine Grenzen zu anderen Segmenten oder dem Hintergrund. Das numerische Analogon einer Sattelstelle (verschwindender Gradient der Grauwerte) oder ein maximaler Gradient kann z.B. eine solche Grenze bilden.

Regionsbezogene Segmentierer weisen die Bildelemente nach ihren Eigenschaften, wie z.B. dem Grauwert oder beliebigen Nachbarschaftsbeziehungen, den Segmenten zu. Ein (gängiges) Kriterium für die Zugehörigkeit zu einem Segment kann das Überschreiten eines Schwellenwertes sein.

Manchmal lassen sich Bildelemente nicht eindeutig einem Segment zuweisen. In solchen Fällen muß man sequentielle und parallele Strategien unterscheiden. Im ersten Fall werden die Segmente sukzessive ermittelt. Dem ersten Segment werden dann alle Pixel bzw. Voxel angehören, die die entsprechenden Kriterien erfüllen oder durch eben-solche Bildelemente eingeschlossen sind.

In parallelen Strategien werden die Segmente gleichzeitig ermittelt. Die Zuordnung nicht eindeutig abzubildender Bildelemente erfolgt dann "gleichmäßiger".

2.2.3.6.1 Zusammenhängende Gebiete mit definierten Eigenschaften

Eine bereichsorientierte Segmentierung zusammenhängender Gebiete stellt das Auf-finden und Kennzeichnen von Objekten dar, deren zugehörige Bildelemente gleiche oder ähnliche Eigenschaften haben und sich in d_{max} - Nachbarschaft zueinander befinden. Ist M die Menge aller Meßwerte und $U \subseteq M$ die Menge aller Meßwerte einer definierten Eigenschaft, so ist

$$V = \{\mathbf{x}_k, \mathbf{x} \in U \mid \exists \mathbf{y} \in V \text{ mit } d(\mathbf{x}, \mathbf{y}) \leq d_{max}\} \quad (2.55)$$

die Menge aller zu einem zusammenhängenden Gebiet gehörenden Meßwerte. \mathbf{x}_k ist das Startelement dieser rekursiven Definition.

V beschreibt allgemein zusammenhängende Gebiete mit Bildelementen aus U . Nach-folgend wird U für verschiedene Segmentierer zur Verwendung in V definiert.

2.2.3.6.2 Segmentierung mit globalem Schwellenwert

Das Auffinden zusammenhängender Gebiete von Voxeln, deren Intensität einen Wert t nicht unterschreiten, also

$$U = \{\mathbf{x} \in M \mid \mathbf{x} > t\}, \quad (2.56)$$

bezeichnet man als Segmentierung mit globalem Schwellenwert. Da es sich hierbei um einen bereichsorientierten Algorithmus handelt, ist dieser als Gruppe 4 (G4) oder Gruppe 3 (G3) Algorithmus zu bezeichnen. Da jedes Bildelement eindeutig zuzuordnen ist, gibt es zwischen paralleler und sequentieller Strategie im Resultat keinen Unterschied.

2.2.3.6.3 Segmentierung mit Hysterese

Der Algorithmus zur Segmentierung mit Hysterese (Zamperoni 1991) definiert zwei Schwellenwerte t_1 und t_2 mit $t_1 > t_2$ und

$$U = \{\mathbf{x} \in M \mid \mathbf{x} \geq t_1 \vee (\mathbf{x} \geq t_2 \wedge \exists \mathbf{y} \in M, \mathbf{y} \geq t_1, d(\mathbf{x}, \mathbf{y}) \leq d_{max})\}. \quad (2.57)$$

Das bedeutet, daß ein Voxel zur segmentierten Menge zählen kann, wenn lediglich der kleinere Schwellenwert t_2 erreicht wird und in der Nachbarschaft eines Voxels liegt, welches t_1 erreicht. Auf diese Weise kann sich ein segmentiertes Gebiet bis in den Hintergrund des Rauschens erstrecken.

2.2.3.6.4 Watershed Segmentierung

Auch in der Watershed-Segmentierung (Vincent u. Soille 1991) werden zusammenhängende Gebiete isoliert. Der Algorithmus ist durch Operatoren der Mathematischen Morphologie definiert und folgt einer eingänglichen Anschauung: Betrachtet man die Grauwerte eines Bildes als die Niveaus eines Gebirges, dreht man dieses auf den Kopf und flutet die Berge, so sind die Orte, an denen das Wasser zweier Berge zusammenläuft, die Grenze zwischen zwei Segmenten. Man kann dies auch in der Form einer sequenziellen Strategie darstellen. Die Kristallisationspunkte der Segmente sind dann die lokalen Grauwertmaxima. Eingeschlossen werden die Gebiete durch lokale Minima und Sattelstellen, d.h. die Definition der geforderten Eigenschaft für die Menge U benötigt den Gradienten, also

$$U = \{\mathbf{x}_k, \mathbf{x} \in M \mid \nabla I_{\mathbf{x}} \neq \mathbf{0}\}. \quad (2.58)$$

Der Kristallisationspunkt \mathbf{x}_k erfüllt nicht die Bedingung des verschwindenden Gradienten und ist deshalb explizit angegeben worden.

Nach Zhang (1997) handelt es sich in dieser Form um einen G2-Algorithmus. Der ursprünglich über die Mathematische Morphologie definierte Algorithmus ist wegen seiner Parallelität ein G1-Algorithmus.

Der Watershed-Segmentierer benötigt keine explizite Parametrisierung. Er ist jedoch rauschsensitiv und übersegmentiert ohne eine adäquate Filterung. Eingesetzt wird zum Beispiel das Adaptive Diffusionsfilter (Sijbers et al. 1997) um die notwendige Glättung der Bildinformation zu erzielen (2.2.3.1).

2.2.3.7 Bestimmung des Schwellenwertes ohne a priori Wissen

Wird ein G3/G4-Segmentierer eingesetzt, d.h. unterscheiden sich das Segment und der Hintergrund durch die Helligkeiten der Voxel in den betreffenden Bereichen des Bildes und ist kein Vorwissen über die Objekte im Bild vorhanden, so bietet sich der iterative Schwellenwert-Selektionsalgorithmus (ITSA, *Iterative Threshold Selection Algorithm*) an, um einen Schwellenwert zu berechnen (Ridler u. Calvard 1978). Dieser Algorithmus setzt sich aus den folgenden vier Schritten zusammen:

-
1. Wähle den mittleren Grauwert des Bildes als initialen Schwellenwert t_i .
 2. Sei t_b der mittlere Grauwert aller Voxel $x \leq t_i$ und t_w der mittlere Grauwert aller Voxel $x > t_i$.
 3. Der neue Schwellenwert ist $t_{i+1} = \frac{t_b + t_w}{2}$.
 4. Verzweige nach 2., wenn $t_i \neq t_{i+1}$.
-

2.2.3.8 Quantifizierung der Segmente

2.2.3.8.1 Gesamtintensität

Die Gesamtintensität $[I]$ eines Segmentes schätzt man als die Summe der Intensitäten I_i aller N zum Segment gehörigen Voxel, also

$$[I] = \sum_{i=1}^N I_i. \quad (2.59)$$

Die Schätzung wird durch Korrektur der Absorption und der Punktverwaschung verbessert.

2.2.3.8.2 Volumen

Das Volumen eines Segmentes kann nach dem Cavalieri-Schätzer (Cruz-Orive 1996) bestimmt werden. Werden N Schichten im Abstand l gemessen und ist a_i der Querschnitt des Segmentes in der i -ten Schicht, so schätzt man das Volumen zu

$$[V] = l \sum_{i=1}^N a_i. \quad (2.60)$$

Dieser Ausdruck ist identisch mit der Summe der Volumina v aller N Kuben eines Segmentes, welche die Voxel repräsentieren:

$$[V] = \sum_{i=1}^N v_i. \quad (2.61)$$

2.2.3.8.3 Oberfläche

Die Verwendung der Manhattan-Metrik zur Berechnung der Oberfläche eines Segmentes in Form des Aufsummierens aller außen liegenden Seitenflächen der äußeren Bildelemente führt zur maximalen Überschätzung derselben. Im Gegensatz zur euklidischen Metrik konvergiert sie nicht mit wachsender Auflösung, sondern behält einen konstanten Fehler bei. Bild 11 macht dies in zwei Dimensionen an einer Umfangsberechnung deutlich.

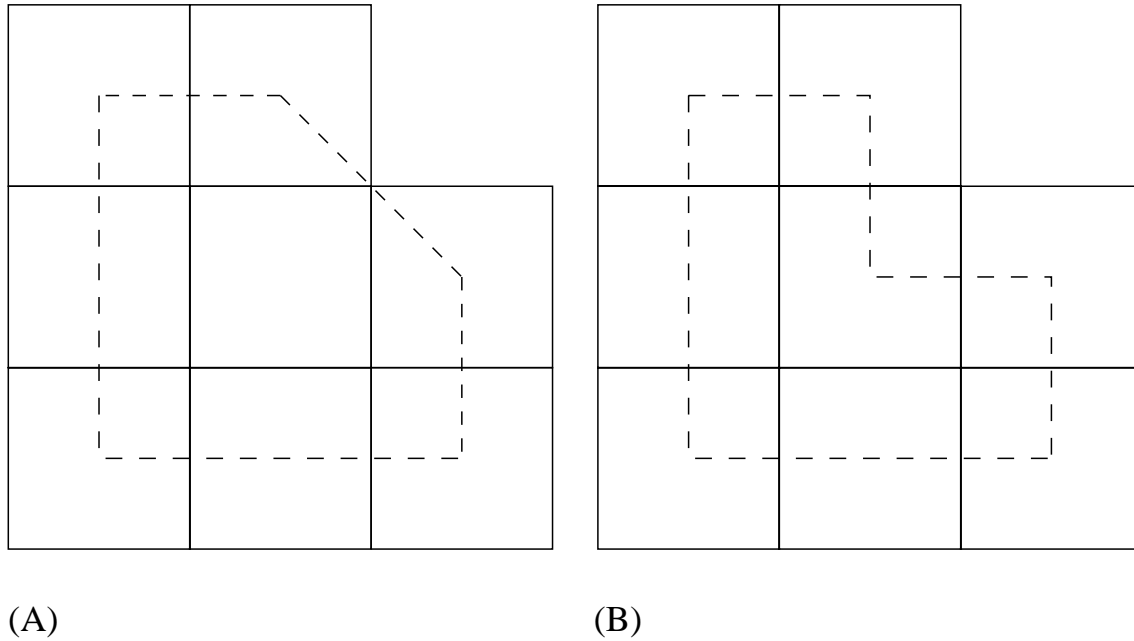


Bild 11: Die gestrichelten Linien zeigen, wie eine Umfangsberechnung an diesen acht Pixeln aussehen kann. In (A) findet die euklidische Metrik, in (B) die Manhattan-Metrik Verwendung.

Um die Konvergenz gegen den wahren Wert der Oberfläche in drei Dimensionen zu erreichen, also die Verwendung der euklidischen Metrik zu ermöglichen, werden die Voxel an der Oberfläche der segmentierten Objekte durch Dreiecke vom Hintergrund abgegrenzt (Triangulierung). Eine bevorzugte Methode stellt der “Marching Cubes”-Algorithmus dar (Lorensen u. Cline 1987).

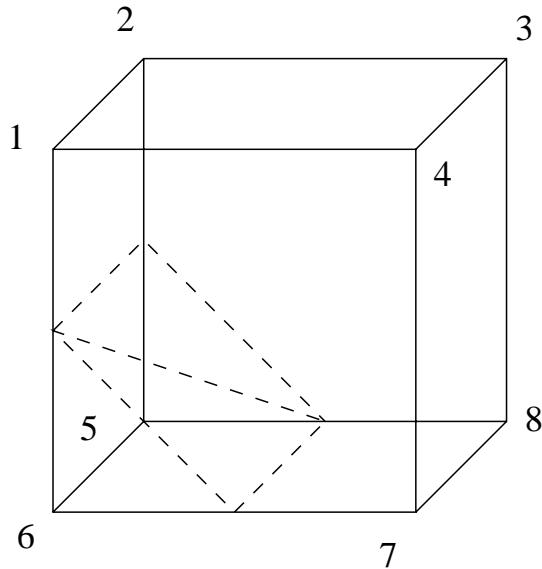


Bild 12: Die gestrichelten Dreiecke stellen eine mögliche Parkettierung nach dem “Marching Cubes”-Algorithmus dar. In diesem Fall gehören die Voxel fünf und sechs dem Segment an und werden von den übrigen Voxeln abgegrenzt.

Diese Methodik betrachtet eine Nachbarschaft von jeweils acht Voxeln. Im einfachsten Fall wird eine Unterteilung der Voxel in zum Segment gehörige und nicht zugehörige Voxel vorausgesetzt. Beide Klassen werden dann durch Dreiecke voneinander abgegrenzt, wie in Bild 12 gezeigt ist.

Wenn für die Voxel neben dieser binären Zuordnung noch der Grad angegeben werden kann, mit dem sie zugehörig sind (z.B. proportional zum Grauwert), können die Eckpunkte der Dreiecke nach “innen” bzw. nach außen verschoben werden. Dies ist äquivalent zur Verschiebung der kubischen Voxel und dieser Vorgehensweise verdankt der Algorithmus den Beinamen “Marching”.

Die Schätzung $[A]$ der Oberfläche A besteht nun darin, die Flächeninhalte aller Dreiecke zu summieren, welche die Voxel innerhalb und außerhalb des Segmentes voneinander

abgrenzen. Nach der Heronischen Formel ist mit a_i, b_i, c_i den Kantenlängen des Dreiecks und $s = \frac{1}{2}(a_i + b_i + c_i)$

$$A_i = \sqrt{s(s - a_i)(s - b_i)(s - c_i)} \quad (2.62)$$

der Flächeninhalt und es ist

$$[A] = \sum_{i=1}^N A_i \quad (2.63)$$

die Abschätzung der Oberfläche, die durch N Dreiecke modelliert ist.

2.2.3.8.4 Position und Lage

Das erste Moment und das zweite zentrale Moment der Grauwertverteilung im Bildstapel gibt Auskunft über die Position und Lage des Segmentes.

Betrachtet man die Grauwerte der N Voxel als Massen m_i , so definiert das erste Moment

$$\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N \mathbf{x}_i m_i \quad (2.64)$$

mit $M = \sum_{i=1}^N m_i$ der Gesamtmasse und $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ der Ortskoordinate des Voxels den Massenschwerpunkt (*Center of mass*, COM).

Das zweite zentrale Moment mit den Komponenten

$$v^j = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N (x_i^j - \bar{x}^j)^2 m_i \quad (2.65)$$

ist genau die Varianz der Verteilung. Der Vektor

$$\mathbf{t} = \mathbf{v} - \bar{\mathbf{x}} \quad (2.66)$$

gibt für Segmente ähnlicher Struktur (Form, Ausdehnung und Verteilung der Grauwerte) ein Maß für ihre Lage.

3

Experimentelle Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 Präparation

Das heparinisierte Blut einer Normalspenderin wird in einem Wachstumsmedium mit 20% fetalem Kälberserum (FKS) aufgenommen (RPMI 1640, Life Technologies). Anschließend werden die Leukozyten (Sie enthalten etwa 60% Lymphozyten) durch Zentrifugation von den Thrombozyten getrennt.

Um Metaphasepräparate zu erhalten, muß eine Stimulation der Lymphozyten mit Phytohämagglutinin (PHA) erfolgen. Es folgt eine Kulturzeit von 48 Stunden, um mitotische Zellen zu gewinnen.

Die Zugabe von Colcemid für vier Stunden vor dem Ende der Kulturzeit zerstört u.a. den Spindelapparat, so daß die mitotischen Zellen in der Metaphase verbleiben.

Nach einer 15-minütigen KCl-Behandlung (0.075 molare Lösung) bei 37° Celsius werden die Lymphozyten nach der Fixierung auf einen kalten Objektträger (OT) aufgetropft.

3.1.1.1 Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wird mit der Sonde "Green COAT 1" (Oncor, Inc.) durchgeführt. Die Prozedur folgt im wesentlichen nicht dem für diese Sonde angegebenen, sondern einem im Institut für Medizinische Strahlenbiologie (Universitätsklinikum Essen) etablierten Protokoll. Die Sonde ist direkt mit dem Fluorochrom "FITC" (*Fluoreszeinisothiozyanat*, 494/520nm) markiert und enthält bereits eine adäquate Menge repetitiver DNA zur Sättigung unspezifischer Sequenzen.

Vor der Hybridisierung wird eine RNase- und eine Pepsin-Behandlung durchgeführt. Die Postfixierung erfolgt mit Paraformaldehyd zur Quervernetzung der Proteine des Zytoskeletts.

Die Denaturierung des Chromosoms erfolgt auf dem OT in 30 Minuten bei 70° Celsius in 90% Formamid.

Die Sonde wird separat in wässriger Lösung fünf Minuten bei 37° Celsius vorgewärmt und 10µl hiervon werden in 10 Minuten bei 70° Celsius denaturiert.

Die Abkühlzeit (Preannealing) der Sonde dauert zwei Stunden bei 37° Celsius. Sie wird dann auf den warmen (42° Celsius) OT aufgebracht und mit dem Chromosom über Nacht bei gleicher Temperatur hybridisiert.

Bei 42° Celsius wird der OT in einer 50% Formamid enthaltenden Waschlösung für je fünf Minuten dreimal gewaschen.

3.1.1.2 Färbung der DNA

60 μ l des im Tris-Puffer gelösten DNA-Farbstoffes Propidium-Jodid (580/605) in der Konzentration 16.7 mg/l werden in je 1 ml eines Eindeckmediums gegeben, das ein “Antifade” (Vectashield, Vector Laboratories inc., Burlingame, CA) enthält, mit dem das Ausbleichen der Färbung vermindert wird. Die Konzentration des gelösten Propidium-Jodids im Eindeckmedium wird in dieser Höhe gewählt, um eine Sättigung zu erreichen, wie sie für quantitative Messungen erforderlich ist.

Etwa 10 μ l der Lösung wird auf die Zellen gegeben. Der OT wird dann mit einem Deckglas abgeschlossen.

Es ist zu beobachten, daß sich eine Sättigung der DNA mit dem Farbstoff nach etwa einem Tag einstellt.

Alle Präparationsschritte sind von der Chemielaborantin Frau S. Nowak und Frau Dipl.-Biol. A. Kryscio durchgeführt worden.

3.1.2 Oberfläche der Chromosomendomänen

Die Oberfläche einer Chromosomendomäne wird von den an ihrer Außenseite liegenden Molekülen und Molekülteilen bestimmt. Zwei unterschiedliche Definitionen basieren auf der Vorstellung von die Atome umgebenden Sphären mit den individuellen van der Waals-Radien. Die Oberfläche dieser Kugelschalen wird als van der Waals molekulare Oberfläche (WMS) bezeichnet.

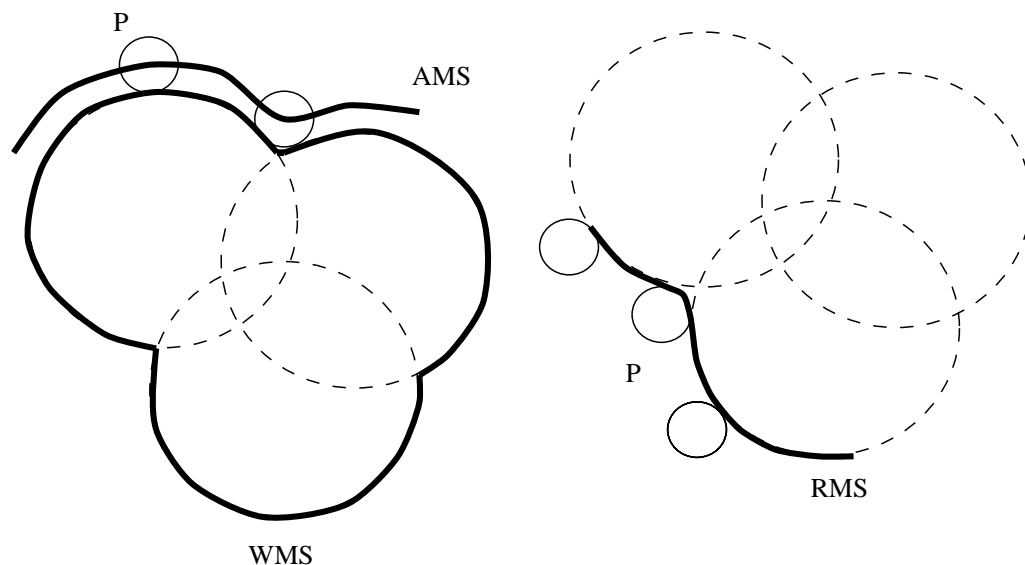


Bild 13: Auf der van der Waals Oberfläche (WMS) wird eine Kugel (P) abgerollt, die die “Zugängliche Oberfläche” (AMS, im linken Bild) und die “Richards Oberfläche” (RMS, rechts) definiert.

Die Definition der zugänglichen Oberfläche (*Accessible Molecular Surface*, AMS) und der *Richards Molecular Surface*, RMS sind in Bild 13 veranschaulicht. Eine Kugel repräsentiert das Volumen, in das ein Lösungsmittel (z.B. H_2O) paßt. Sie wird über die WMS geführt und berührt die durch sie definierte RMS. Die Oberfläche, die durch den Mittelpunkt dieser Kugel definiert wird, ist die AMS.

Es ist fluoreszenzmikroskopisch nicht möglich, die molekularen “Feinstrukturen” im Chromosom zu erfassen. Man muß daher die Strukturen außer acht lassen, die weit unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops liegen. Anders ausgedrückt ist die gemessene Oberfläche auf der Skala der WMS, AMS oder RMS Definitionen planar. Man wird also die “wahre” Oberfläche weit unterschätzen.

3.2 Physikalische Grundlagen

3.2.1 Messung des Signal/Rausch-Verhältnisses

Die Bestimmung des Signal/Rausch-Verhältnisses dient nicht ausschließlich zur Charakterisierung des Laserscanning-Mikroskops (LSM), sondern ist in Zusammenhang mit dem Wiener Filter (2.2.3.2.2) insbesondere von praktischem Interesse.

Murray (1998) benutzt das folgende Verfahren in der zweidimensionalen Bildverarbeitung. Zunächst erfolgt eine Tiefpaßfilterung durch Mittelwertbildung (2.2.3.1.2) mit dem 3x3 Kernel

$$s = \begin{bmatrix} \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \\ \frac{1}{9} & \frac{1}{9} & \frac{1}{9} \end{bmatrix}. \quad (3.1)$$

Das Resultat

$$a = s \otimes o, \quad (3.2)$$

mit s dem Kernel für die Filterung und o dem Originalbild, wird als “durchschnittliches Signal” bezeichnet und vom Originalbild o subtrahiert, um ein “Rauschbild” n zu definieren:

$$n = o - a. \quad (3.3)$$

Die N Bildelemente des Rauschbildes werden quadriert und die Quadratwurzel des Mittelwertes hieraus wird als “Root Mean Square” (RMS) Rauschen bezeichnet:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N n_i^2}. \quad (3.4)$$

Das Signal/Rausch-Verhältnis (*Signal/Noise Ratio*, SNR), ergibt sich dann als Verhältnis des Mittelwertes der Bildelemente im durchschnittlichen Signal zum RMS-Wert, also

$$SNR = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N a_i}{RMS}. \quad (3.5)$$

Die Erweiterung der SNR-Definition für die dreidimensionale Bildverarbeitung ist einfach. Anstatt des 3x3 Kernels (3.1) wird nun ein äquivalentes 3x3x3 Kernel verwendet.

Für das Wiener Filter wird das Signal/Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von den Raumfrequenzen benötigt. Die Gleichung (3.5) liefert dieses, wenn dem Formalismus für jede Raumfrequenz ein Bild angeboten wird, welches mit dem entsprechenden Ein-Frequenz Bandpaßfilter gefiltert wurde.

In dieser Arbeit wird eine etwas andere Definition verwendet. Es ist einfacher, das Verhältnis direkt aus den Fourier-Spektren des Rauschbildes, das wie gehabt durch (3.1) bestimmt wird, und des durchschnittlichen Bildes zu berechnen:

$$\mathcal{SNR} = \frac{|A|^2}{|N|^2} . \quad (3.6)$$

Wie üblich bezeichnen A und N hier wieder die Fouriertransformierten von a und n .

3.2.2 Analyse der Lichtausbreitung in Chromosomendomänen

3.2.2.1 Streuung als Störung in der Abbildung

Licht wird gestreut, wenn es Medien mit variierender optischer Dichte n durchläuft. Dieser Effekt spielt in der Mikroskopie biologischer Zellen eine Rolle (Dunn 1997). Die Streuung wird als eine Störung der Abbildung betrachtet. Um eine Abschätzung über Qualität und Quantität dieser Art von Störung in Chromosomendomänen zu machen, wird ein Modellsystem auf einem Computer implementiert und analysiert.

3.2.2.2 Das Modell

Das dreidimensionale Modellsystem (Bild 14) soll vereinfachend die wesentlichen Bestandteile (bezüglich ihrer optischen Dichte) eines präparierten Zellkerns enthalten, also die Kernmembranen, das Chromatin und die umgebende Flüssigkeit (das Eindeckmedium). Jeder Bestandteil geht durch eine optische Dichte n in das Modell ein.

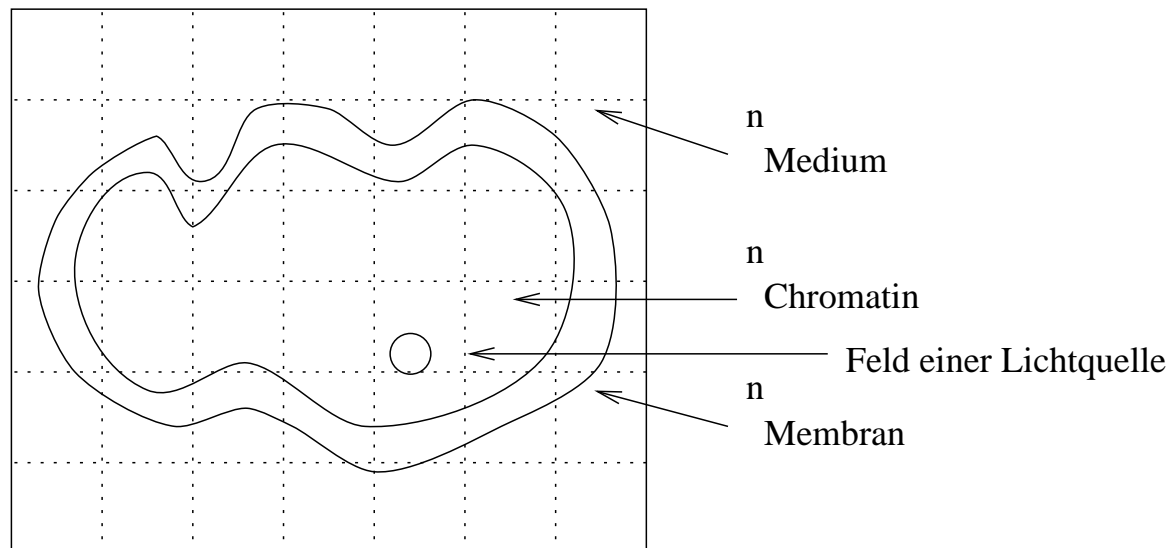


Bild 14: Das Modell unterteilt ein Szenario wie oben dargestellt in endliche Volumenelemente. Jedes dieser Elemente bekommt eine optische Dichte n zugewiesen, die sich als Mittelwert der Dichten im Szenario innerhalb des Elementes ergeben.

Um eine Verarbeitung durch einen Digitalcomputer zu ermöglichen, wird das Modell in angeordnete, kubische Elemente endlicher Ausdehnung, also Voxel, unterteilt, welche jeweils ein konstantes n und das elektrische bzw. magnetische Feld an diesem Ort enthalten.

Durch numerische Integration der Maxwell-Gleichungen (2.2.2) werden die elektromagnetischen Felder in der Zeit entwickelt, d.h. durch das Modell propagiert.

Die durch die räumliche Endlichkeit des Modells auftretenden Probleme mit der Berechnung der Felder am Rand werden minimiert, indem das Modellsystem ausreichend groß gewählt wird.

Um eine Situation der Fluoreszenz-Mikroskopie studieren zu können, wird ein Hertz-scher Dipol als Simulation eines Fluorochroms in den modellierten Zellkern eingesetzt. Dabei wird der Dipol nicht explizit durch die Maxwell-Gleichungen berechnet, sondern seine bekannte Lösung direkt in das Modell eingesetzt.

3.2.2.3 Die numerische Berechnung im Modell

Zur Analyse der Streuung soll das Modell im Computer einer elektromagnetischen Welle des optischen Spektrums (Licht) ausgesetzt werden. Da es Elemente enthält, die sehr viel kleiner als eine Wellenlänge des sichtbaren Lichtes sind, verbietet sich die Benutzung der geometrischen Optik von selbst und wir müssen auf die Formulierung der Elektrodynamik zurückgreifen (2.2.2).

Nach Taflove u. Brodwin (1975) sollte aus Stabilitätsgründen der Gitterabstand Δx nicht größer als $\frac{\lambda}{10}$ und für ein zweidimensionales Modell der Integrationsschritt $\Delta t = \frac{\Delta x}{c\sqrt{2}}$ gewählt werden, wobei c die Vakuumlichtgeschwindigkeit ist.

Eine höhere Genauigkeit der Rechnung wird erreicht, indem man die Stützstellen (Punkte im Gitter) des Magnetfeldes gegenüber denen des elektrischen Feldes um $\frac{\Delta x}{2}$ versetzt (Yee 1966), wie man in Bild 15 sehen kann. Dann verschiebt sich jedoch auch die Zeitkoordinate t um $\frac{\Delta t}{2}$. In der Implementierung der Rechnungen auf einem Computer ist dem durch ebenfalls zeitversetzte Wahl der Anfangsbedingung für das Magnetfeld Rechnung zu tragen. Für die Wellenlänge λ sowie $E(t_0) = 0$ und $B(t_0) = 0$ gilt im Zeitschritt $N\Delta t$ für den Realteil der Felder:

$$E^N = E_0 \cos \frac{Nc\Delta t}{\lambda} \quad (3.7)$$

und

$$B^N = B_0 \cos \frac{(N + \frac{1}{2})c\Delta t}{\lambda}. \quad (3.8)$$

Im homogenen Medium (d.h. ein konstantes n) bedeutet ein Zeitversatz der einfallenden Felder um t eine räumliche Verschiebung des gesamten Systems um ct . Durch diesen Versatz der Felder gegeneinander ändert sich die Definition des Differenzenquotienten. Differenzen eines Feldes können nun zwischen zwei benachbarten Punkten im Gitter gebildet werden, da die numerische Ableitung genau zwischen diesen Punkten gesucht ist, also gilt

ohne Beschränkung der Allgemeinheit für ein *beliebiges* Feldes \mathcal{U} :

$$\frac{\Delta \mathcal{U}(i + 0.5)}{\Delta x} = \frac{\mathcal{U}(i + 1) - \mathcal{U}(i)}{\Delta x}. \quad (3.9)$$

Dieser Umstand führt durch den Übergang $2\Delta x \rightarrow \Delta x$ zur bestmöglichen Erhaltung der Modellgröße bei Bildung des beidseitigen Differenzenquotienten (Im idealen Fall führt die Bildung der Differenzenquotienten von N Stützstellen zu $N - 1$ Werten).

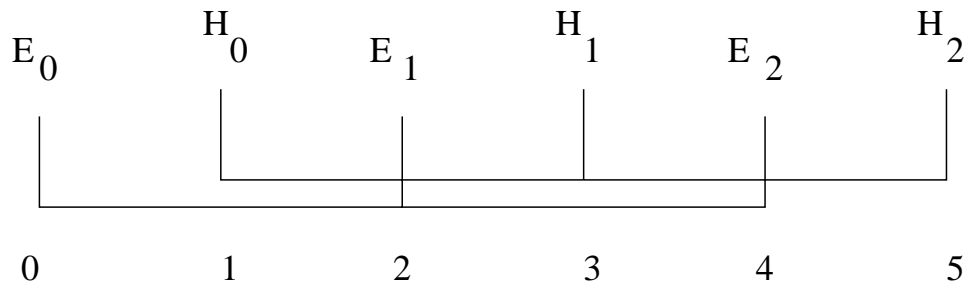


Bild 15: Versatz von elektrischem Feld und Magnetfeld gegeneinander im Gitter. Die **E**-Felder sind in diesem Beispiel an den Orten 0,2,4 und die **H**-Felder an den Orten 1,3,5 definiert.

3.2.3 Testobjekte zur Vermessung des Mikroskops

Verschiedene Charakteristika des Mikroskops lassen sich durch Messung bekannter Testobjekte bestimmen. Auch am eigentlichen Untersuchungsgegenstand können objektabhängige Eigenschaften des Mikroskops untersucht werden.

Übliche Testobjekte sind die sogenannten “Beads”, also durchsichtige Kunststoffkügelchen mit Fluorochrom-Einschlüssen. Die Firma Molecular Probes bietet verschiedene für diese Arbeit verwendete Produkte an:

Größenstandards: Die experimentelle Bestimmung der Punktverwaschungsfunktion erfordert Objekte, die kleiner als das Auflösungsvermögen des Mikroskops sind. Die $100nm$ großen “*Microspheres*” sind ein guter Kompromiß zwischen Größe und Leuchtintensität. Sie lassen sich mit einer Wellenlänge von $488nm$ anregen und emittieren bei $\lambda = 605nm$.

Intensitätsstandards: Quantitative Messungen der Fluoreszenzintensität, wie sie in dieser Arbeit erforderlich sind, erfordern eine diesbezüglich lineare Übertragungsfunktion. Die Überprüfung erfolgt mit Intensitätsstandards (*InSpeck Calibration Kit*). Verwendet werden Beads der Größe $1\mu m$, der Anregungswellenlänge $580nm$ und einer Fluoreszenz bei $605nm$. Sie sind erhältlich mit den relativen Intensitäten 100%, 42.6%, 6.4%, 2.8%, 1.6%, 0.6% und 0% (zur Bestimmung der Fluoreszenz des Kunststoffes).

Mehrfarbige Beads: Wenn die zu vermessenden Objekte mehrere Fluorochrome enthalten, die sich durch unterschiedliche Wellenlängen anregen lassen bzw. emittieren, so muß ggf. mittels Bildverarbeitung für die Deckungsgleichheit der Abbildungen von den unterschiedlichen Spektralbereichen gesorgt werden. Den Versatz der aufgezeichneten Bilder in unterschiedlichen Wellenlängen kann man mit mehrfarbigen Beads bestimmen. Die *TetraSpeck*-Beads sind $2.5\mu m$ groß und enthalten Fluorochrome mit den Anregungs-/Emissionspeaks $365/460nm$, $505/515nm$, $560/580nm$ und $660/680nm$.

Das Ausbleichen der Messobjekte und das Signal/Rausch-Verhältnis sind Beispiele für Charakteristika, die nicht nur vom LSM, sondern vom Objekt selbst abhängen. Diese sollten daher auch durch die für die geplanten Untersuchungen typischen Objekte bestimmt werden, idealerweise also am Untersuchungsgegenstand selber. In diesem Fall handelt es sich um humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Normalspenderin.

3.2.4 Visualisierung

Neben der quantitativen Beschreibung der untersuchten Objekte (DNA-Gehalt, Volumen, etc.) ist auch eine Beurteilung der Rohdaten (das Bildmaterial) für den Experimentator von Bedeutung. Insbesondere die korrekte Abbildung der Messungen auf die Ausgabegeräte ist zu beachten.

Dreidimensionale Messungen, wie sie mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop möglich werden, sind in der Einzeldarstellung der aufgezeichneten Schichten (die Bilder in unterschiedlichen Tiefen) wenig intuitiv, so daß eine plastische Abbildung wünschenswert erscheint.

3.2.4.1 Korrektur der Intensitätsübertragung

Die Übertragung der Intensität I_0 durch eine Bildröhre erfolgt in etwa durch

$$I \approx I_0^\gamma, \quad (3.10)$$

wobei γ zwischen 2.3 und 2.6 liegt (Poynton 1993). Die visuelle Perzeption des Menschen erfolgt mit der Quadratwurzel der empfangenen Intensität, so daß der Bildschirm ein reales Empfinden für die Grauwerte ermöglicht. Dies ist jedoch häufig nicht erwünscht, weil die Abbildungen nicht den Alltagserfahrungen entsprechen. Die Kompensation erfolgt daher durch

$$I_0 \approx I^{1/\gamma}. \quad (3.11)$$

Die Ausgabe von Grauwertbildern auf Druckern hängt von der verwendeten Methode des “Ditherings” (gemeint ist hier die Abbildung von Grautönen durch schwarze und weiße Punkte) ab, ist aber in der Regel linearer als die Ausgabe auf den Computermonitor.

3.2.4.2 Plastische Abbildung

Die dreidimensionalen Meßergebnisse $I(\mathbf{x})$ lassen sich von einem virtuellen Betrachter \mathbf{b} aus auf eine Ebene (die man sich als den Bildschirm vorstellen kann) projizieren, die durch die Vektoren \mathbf{p}_1 und \mathbf{p}_2 und einem Ursprung \mathbf{p}_o definiert ist. Man muß zu diesem Zweck die Schnittpunktgleichung

$$\lambda_1 \mathbf{p}_1 + \lambda_2 \mathbf{p}_2 - \lambda_3 \mathbf{x} = \mathbf{b} - \mathbf{p}_o \quad (3.12)$$

für die Parameter $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ lösen. Um eine Scherung in der Abbildung zu vermeiden, sollten die Vektoren, die die Ebene aufspannen, senkrecht zueinander stehen. Sind sie darüberhinaus auch so normiert, daß ihre Norm einem Bildelement auf dem Ausgabegerät entspricht, geben λ_1 und λ_2 direkt die Koordinaten an.

Wenn die Oberfläche des gemessenen Objektes durch Flächen pakettiert ist, die durch \mathbf{a}_1 und \mathbf{a}_2 aufgespannt werden und ist \mathbf{p} der Normalenvektor

$$\mathbf{p} = \mathbf{a}_1 \times \mathbf{a}_2, \quad (3.13)$$

so kann mit einer Lichtquelle am Ort \mathbf{s} der Grauwert

$$\hat{I} = I(\mathbf{s}' \cdot \mathbf{p}') \quad (3.14)$$

bestimmt werden (\mathbf{s}' und \mathbf{p}' sind die normierten Vektoren von \mathbf{s} und \mathbf{p}). Bild 16 zeigt eine derartige Abbildung zweier Chromosomen-Domänen.

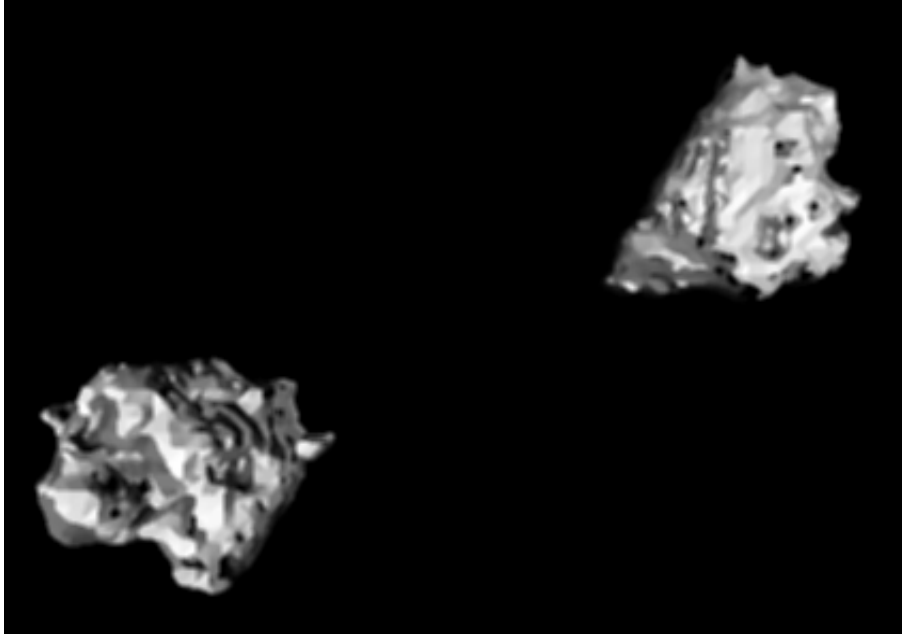


Bild 16: Zwei Chromosomendomänen sind durch den “Marching Cubes”-Algorithmus pakettiert und auf eine Ebene abgebildet worden.

Neben dieser Technik, die eine punktförmige Lichtquelle erfordert, die weit von den Voxeln entfernt liegt, können auch sogenannte “Raytracing”-Programme eingesetzt werden. Die Bilder 17 bis 19 zeigen das Ergebnis dieser Technik, bei der auch Lichtreflektionen und Schatten berücksichtigt werden. Gezeigt ist die durch den Fluoreszenz-Farbstoff Propidium-Jodid markierte DNA eines Lymphozytenkerns (Bild 17), die hybridisierten Domänen des Chromosomenpaares 1 (Bild 18) und eine Kombination beider Szenarien, die einen Einblick in den Kern gewährt (Bild 19).

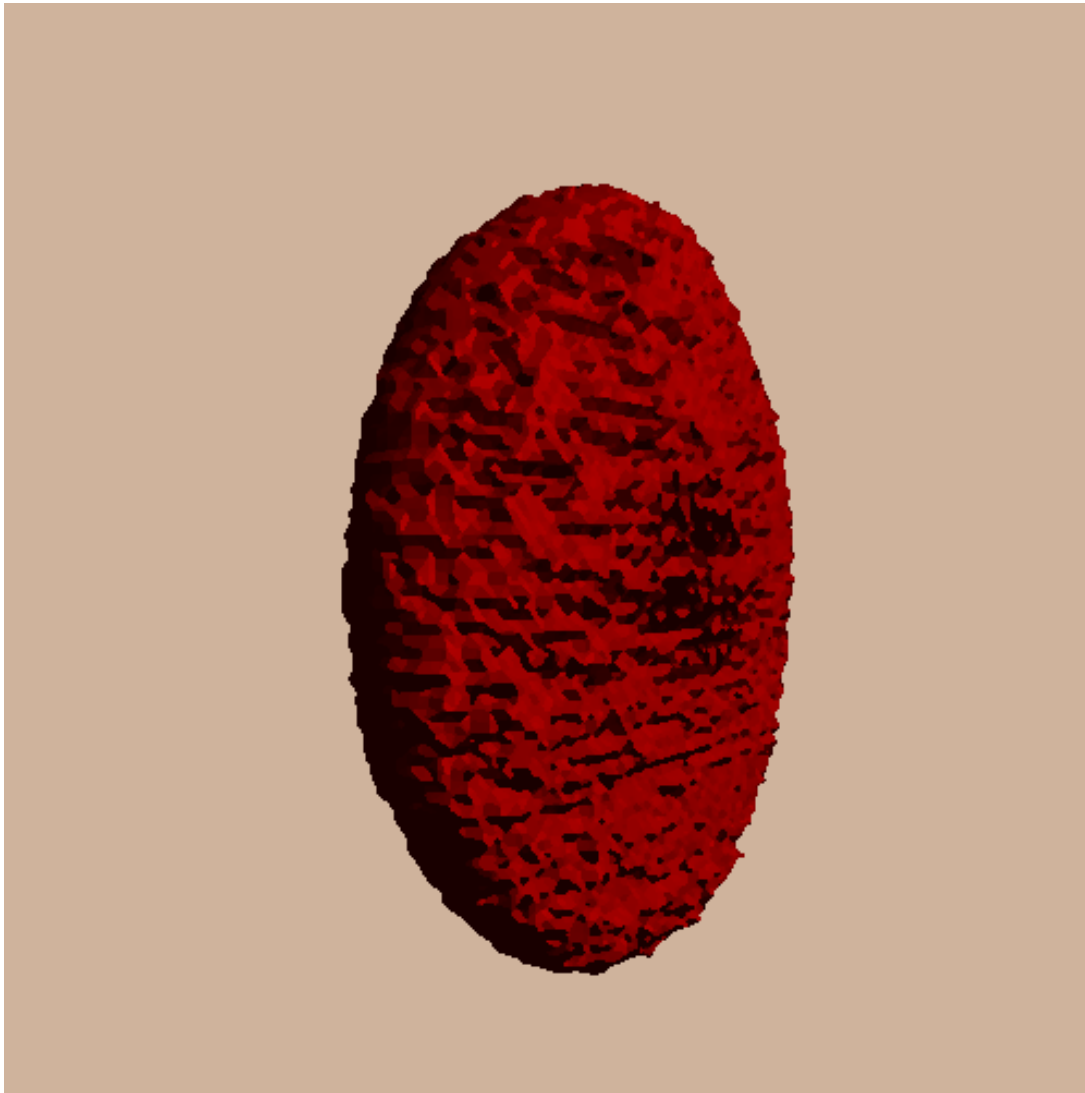


Bild 17: Die DNA eines Lymphozytenkerns ist mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Propidium-Jodid markiert worden. 20 Aufnahmen in unterschiedlichen Tiefen des Zellkerns, die mit einem Laserscanning-Mikroskop gemacht wurden, ergeben zusammen mit einer dreidimensionalen Bildverarbeitung (Segmentierung, Triangulierung und Visualisierung) das hier gezeigte Ergebnis.

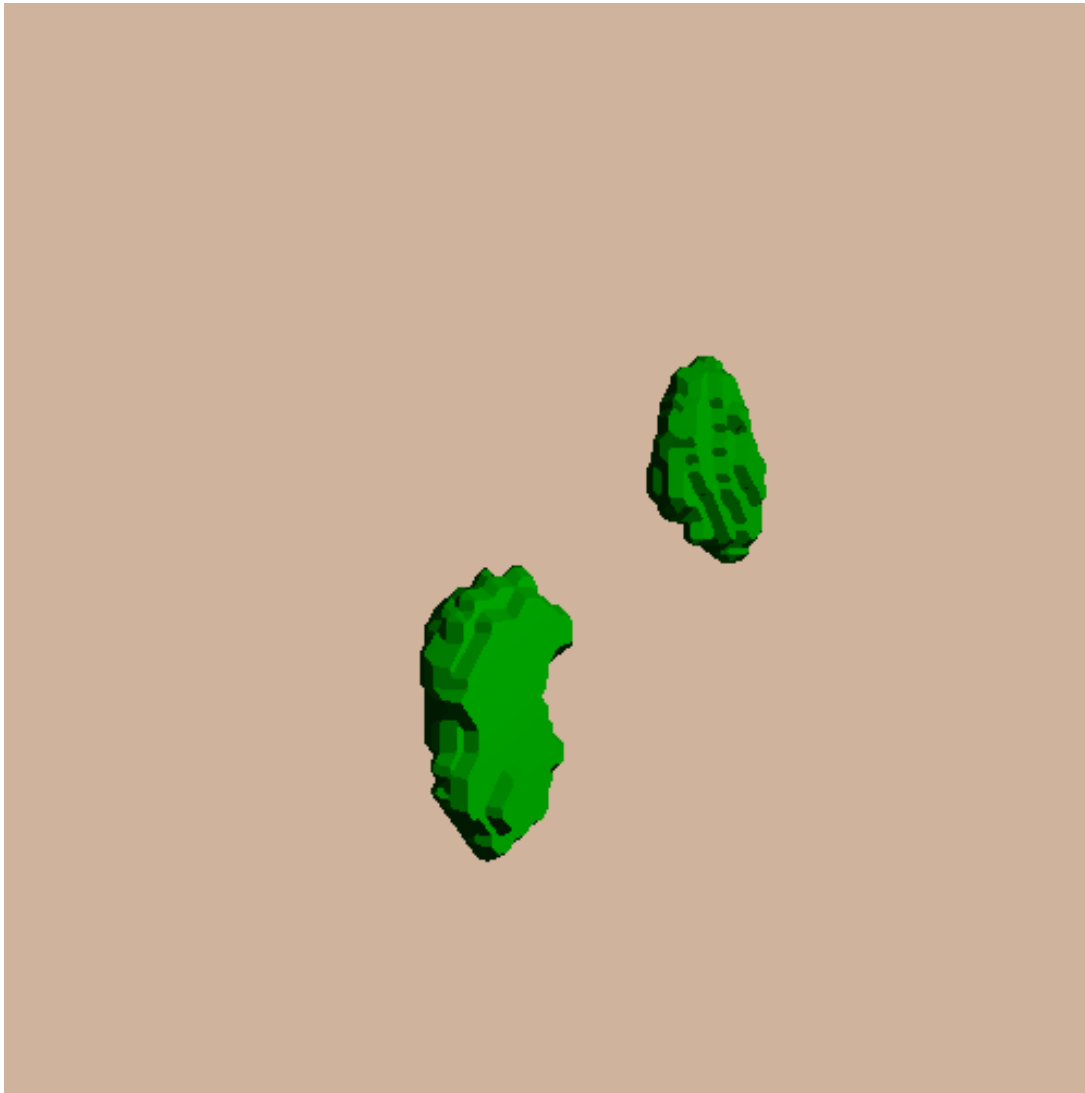


Bild 18: Zu sehen ist das markierte homologe Chromosomenpaar 1 aus dem Zellkern, dessen DNA in Bild 17 gezeigt ist. Die Aufnahmen der einzelnen Schichtbilder (gemeint sind die Bilder in den unterschiedlichen axialen Tiefen) sind parallel zu den Aufnahmen der Zellkern-DNA gemacht worden.

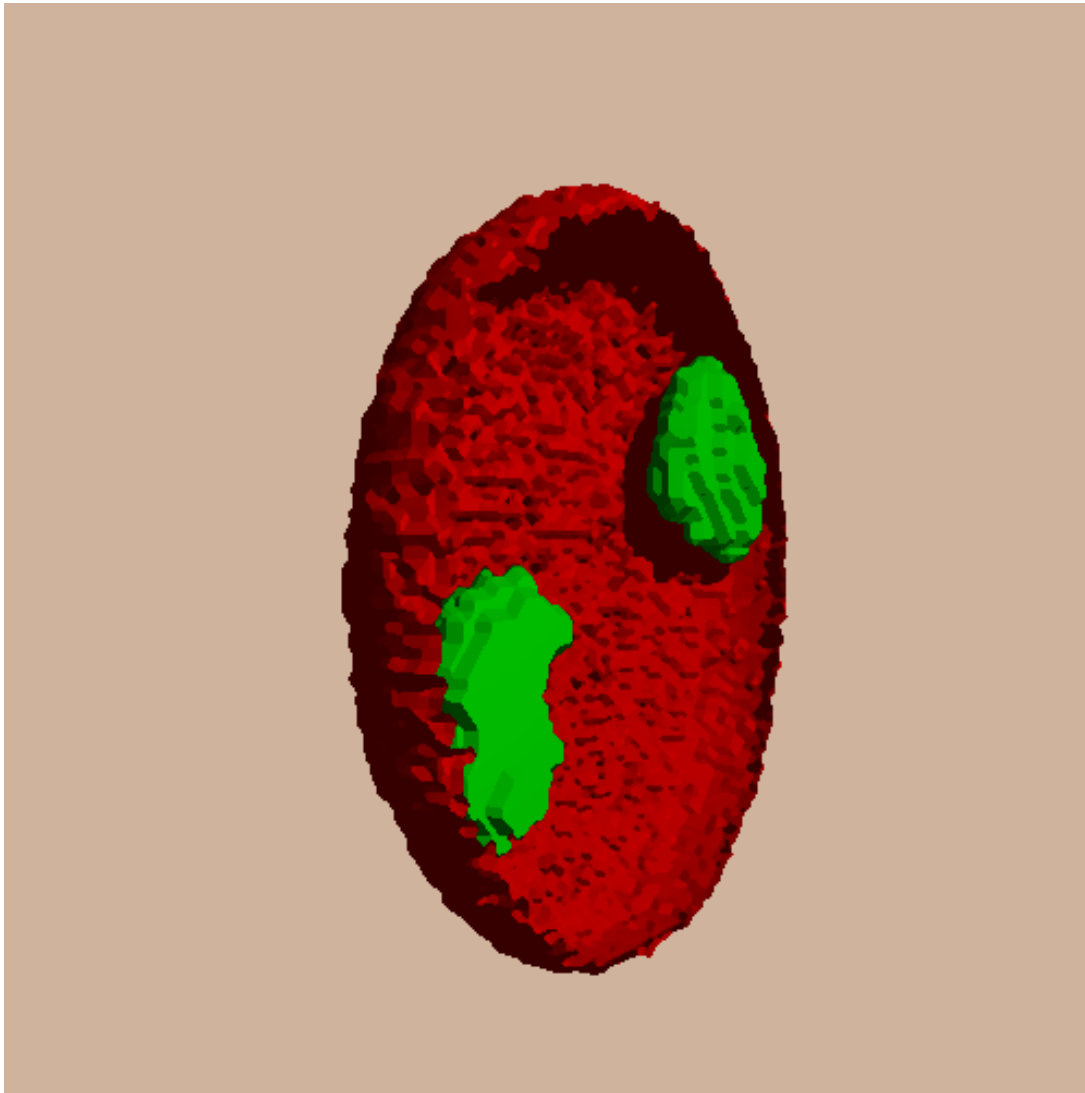


Bild 19: Die Aufnahmen der Zellkern-DNA und des Fluoreszenz in situ hybridisierten Chromosomenpaares 1 eines Lymphozytenkerns sind in diesem Bild gemeinsam visualisiert. Der Kernbereich (Rot) ist “geöffnet”, um einen Blick auf die Chromosomendomänen (Grün) zuzulassen.

3.2.5 Beschreibung des Meßplatzes

Alle Präparate wurden mit dem konfokalen Laserscanning Fluoreszenzmikroskop Leica TCS 4D durchgeführt. Das Gerät basiert auf dem Forschungsmikroskop Leica DMRBE, in welches über Lichtleiter der Argon-Krypton Laser eingekoppelt ist, der die Anregung mit den Wellenlängen 488, 567 und 647 nm ermöglicht. Die laterale Abtastung wird über zwei Galvanometer realisiert und ein Piezokristall justiert die Tischhöhe, um die axiale Koordinate einzustellen.

Alle Messungen werden mit einem 100er Objektiv mit der numerischen Apertur 1.3 durchgeführt.

Durch eine Lochblende, deren Durchmesser mit einer Quantisierung von 256 möglichen Werten zwischen 25 und 500 μm eingestellt werden kann, gelangt das Fluoreszenzlicht in zwei Detektoren, so daß zwei Emissionsfrequenzen simultan detektiert werden können. Die Detektoren lassen sich mit bis zu 1 kV Beschleunigungsspannung aussteuern. Das detektierte Signal wird durch 8-Bit Wandler digitalisiert. Es stehen verschiedene Filter zur Auswahl, die den Detektoren unmittelbar vorgeschaltet sind.

Das Mikroskop wird über einen VME-Bus Rechner gesteuert, an dem ein PC als grafisches Interface angeschlossen ist. Die mitgelieferte Software erlaubt die automatische Aufzeichnung dreidimensionaler Bilder, wobei die laterale Auflösung auf $x \mu m / 512$ Pixel und $y \mu m / 512$ Pixel begrenzt ist mit $x, y \in [3.13, 100]$ (bei Verwendung des 100er Objektivs).

Die Bildverarbeitung wurde auf einem weiteren PC (PentiumPro 200MHz) realisiert, der durch ein selbstentwickeltes "Server/Client"-System die Bilder vom VME-Rechner über eine serielle Schnittstelle abrufen kann.

In der Programmiersprache "C" wurden unter dem Betriebssystem *Linux* alle notwendigen Algorithmen implementiert. Eine Ausnahme bildet das optimierte ICTM-Filter, welches in (Verveer u. Jovin 1997) beschrieben wurde und zur allgemeinen Verfügung steht.

4

Resultate

4.1 Die Vorgehensweise bei Messung und Auswertung

In Lymphozyten aus dem peripheren Blut einer Normalspenderin sind die beiden Chromosomen des Chromosomenpaares 1 mit einer FITC- (*Fluoresceinisothiozyanat*) markierten Sonde hybridisiert und die DNA mit PJ (*Propidium Jodid*) gefärbt worden.

Die Detektionslochblende wurde auf den relativen Wert 90 ($\approx 200nm$) eingestellt und die Beschleunigungsspannungen für den Rot- und Gründetektor wurde zu 580V bzw. 820V gewählt, um den Dynamikbereich des Detektors auszuschöpfen.

In einem Volumen von $10 \times 10 \times 10\mu m$ sind in beiden Spektralbereichen gleichzeitig jeweils 20 Bilder in äquidistanten ($500nm$) axialen Tiefen aufgezeichnet worden. Im Normalfall passen humane Lymphozyten sehr gut in dieses Volumen. Aufgrund der schlechten axialen Auflösung von über $400nm$ (4.2.2) ist der hoch erscheinende Abstand zwischen den Aufnahmen, der aus Gründen der Rechenzeit- und Speicheranforderungen so gewählt worden ist, gerade noch ein akzeptabler Kompromiß.

Da das Reflektionslicht der PJ-Anregung im FITC Detektor registriert wird und eine etwa $1\mu m^2$ große Struktur in der Bildmitte verursacht, muß auf eine Positionierung außerhalb dieses Reflexes geachtet werden.

Unter identischen Bedingungen wurde auch mittels Standardbeads die PSF (*Point Spread Function*) aufgenommen sowie die Linearität der Intensitätsübertragung überprüft.

Die Messungen wurden einer Fading-Korrektur unterzogen und je nach der zu erfolgenden Untersuchung der entsprechenden Vorbehandlung zugeführt (z.B. Rauschfilterungen).

4.2 Eigenschaften des Mikroskops

4.2.1 Linearität der Messung

Mit den *InSpeck*-Beads (Bilder 20f) ist die Abbildung der Fluoreszenzintensität untersucht worden. Das LSM wurde dabei so eingestellt, wie es anschließend für die Messungen der humanen Chromosomen erforderlich war. Die Verstärkerspannung für den Rot-Detektor lag also bei 580V, das Pinhole hatte die relative Größe 90.

Die Linearität ist wichtig für die quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes. Da dieser mit Propidium-Jodid, einem roten Fluorochrom, bestimmt wird, wurden Intensitätsstandards mit den Peaks 580/605nm verwendet. Diese Testkörper haben die Struktur einer Kugelschale.

Bild 20 zeigt exemplarisch drei Aufnahmen, die unter diesen Bedingungen von den Beads der relativen Intensitäten (I_r) 42.6%, 6.4% und 2.8% (bezogen auf den “hellsten” Standard mit 100%) gemacht wurden. In Bild 21 ist zusätzlich eine Szene von Beads mit $I_r = 1.6\%$ zu sehen (links). Nur diese Standards liegen im Übertragungsbereich des Detektors.

Pro relativer Intensität wurde von 10 Beads je ein Schnittbild vermessen. Der notwendige Schwellenwert t , der die Beads vom Hintergrund trennt, wurde iterativ mit dem ITS-Algorithmus (*Iterative Threshold Selection*) bestimmt (2.2.3.7). Dies war notwendig, da kein Vorwissen über die abgebildete Helligkeit der Beads vorhanden war. Bild 21 zeigt aber am Beispiel der dunkelsten Aufnahme, daß dieser Algorithmus plausible Ergebnisse liefert. Der hier gefundene Schwellenwert $t = 7$ wurde für alle Schnittbilder verwendet. Segmentiert wurden dann zusammenhängende Gebiete (2.2.3.6.1 f) mit genau diesem globalen Schwellenwert. Die Intensitäten $[I]$ mit den Standardabweichungen σ wurden durch Gleichung 59.2 abgeschätzt, und sind in der sich anschließenden Tabelle gezeigt. Alle Angaben sind auf 42.6% normiert.

I_r	$[I]$	σ
42.6%	195975.3 (42.6%)	2573 (1.3%)
6.4%	45135.1 (9.8%)	1103.9 (2.4%)
2.8%	21585.0 (4.69%)	697.6 (3.2%)
1.6%	9709.3 (2.11%)	177.8 (1.8%)

Tabelle 2: Die Intensitätsstandards sind den gemessenen Werten gegenübergestellt. Beide sind auf 42.6% normiert.

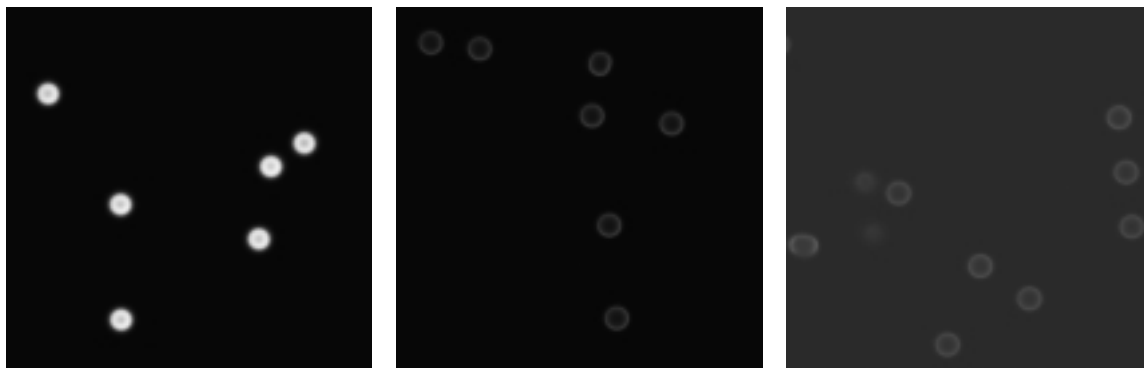


Bild 20: In diesen Schnittbildern von Beads mit den relativen Intensitäten 42.6%, 6.4% und 2.8% (von links nach rechts) erkennt man, daß es sich bei diesen Testobjekten tatsächlich um Kugelschalen handelt. Das ist jedoch für die Untersuchung ohne Belang. Das rechte Bild mußte einer leichten Gamma-Korrektur ($\gamma = 1.5$) unterzogen werden.

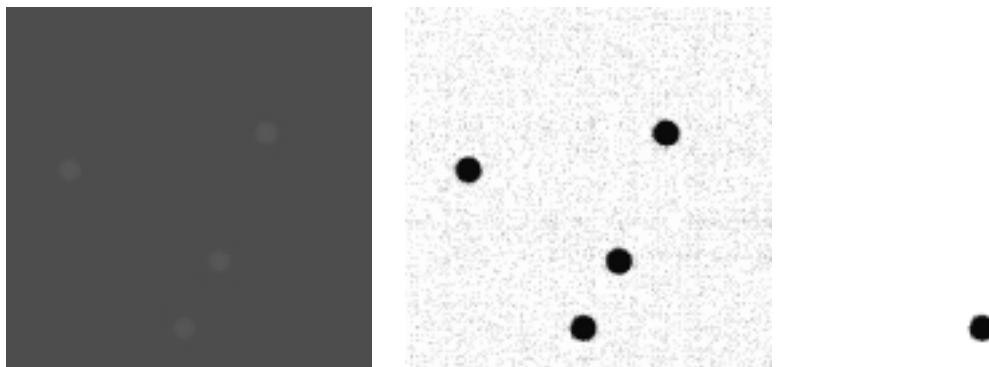


Bild 21: Von links nach rechts ist eine Aufnahme von Beads der relativen Intensität 1.6%, das Schwellenwertbild ($t = 7$) und ein durch den Segmentierer¹¹ isoliertes Bead zu sehen (Jedes segmentierte Objekt wird in einer separaten Bilddatei bzw. Bildstapel gespeichert). Die Intensität liegt am unteren Ende des Dynamikbereiches des Detektors, so daß hier zur Visualisierung eine Gamma-Korrektur ($\gamma = 2$) erfolgen mußte.

¹¹ Segmentiert wurde ein zusammenhängendes Gebiet mit globalem Schwellenwert

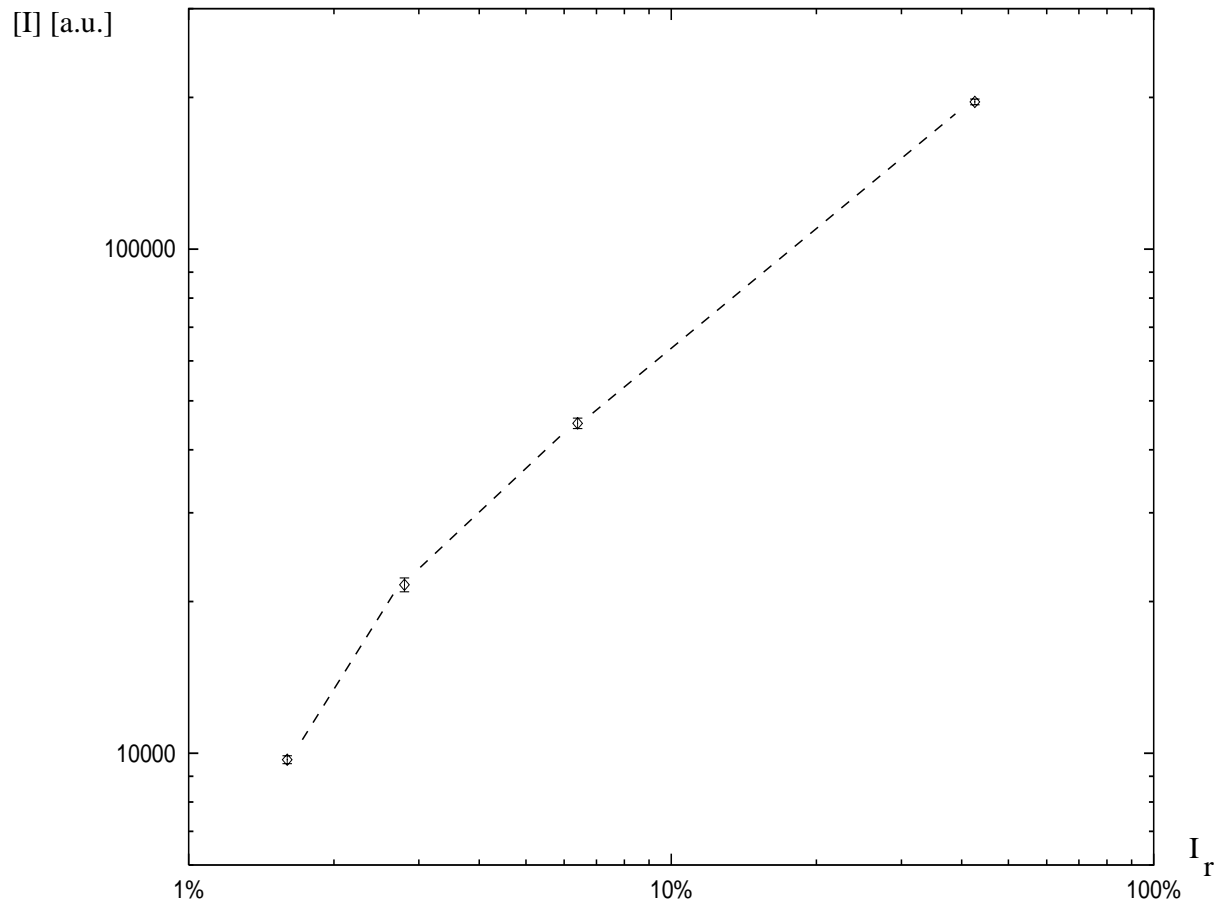


Bild 22: Die durch die Bildverarbeitung berechnete Intensität $[I]$ ist in diesem doppelt-logarithmischen Diagramm gegen die vom Hersteller angegebene relative Fluoreszenzintensität aufgetragen. Am unteren Ende des Dynamikbereiches kommt es zu einem Abfall der übertragenen Intensität.

Bild 3 zeigt die durch die Bildverarbeitung gemessenen Intensitäten zusammen mit den Fehlerbalken in einem doppelt-logarithmischen Diagramm. Man sieht hier einen Abfall der übertragenen Intensität am unteren Ende des Dynamikbereiches des Systems.

Der Hersteller gibt für die *InSpeck*-Beads eine Schwankungsbreite von maximal 10% um den Mittelwert an. Die geleisteten Untersuchungen zeigen die in der folgenden Tabelle angegebenen maximalen Schwankungen um den Mittelwert.

I_r	SB
42.6%	3.4%
6.4%	7.1%
2.8%	8.0%
1.6%	5.1%

Tabelle 3: Die Meßwerte verteilen sich in einem Intervall, das kleiner als das vom Hersteller angegebene 10% Intervall ist

Die Beads mit der geringeren relativen Fluoreszenzintensität können den vollen Übertragungsbereich des Detektors nicht ausnutzen, daher ist mit abnehmender Übertragung der Intensität ein Abfall des Signal/Rausch-Verhältnisses (SNR) zu erwarten. Das SNR ist an den segmentierten Beads berechnet worden, um den Hintergrund auszublenden und somit nur die Objekte von Interesse zu charakterisieren. Die nach Gleichung (3.5) berechneten SNR-Werte sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

I_r	SNR
42.6%	2.41
6.4%	0.91
2.8%	0.47
1.6%	0.23

Tabelle 4: Das “Nutzsignal” wird mit abnehmender Intensität schwächer und sorgt damit für einen Abfall des Signal/Rausch-Verhältnisses.

4.2.2 Die Punktverwaschungsfunktion

Die Punktverwaschungsfunktion (*Point Spread Function*, PSF) beschreibt die natürliche Verbreiterung des Anregungs- und Emissionslichtes in optischen Systemen (2.2.1.2). Man kann sie durch Lichtquellen, die sehr viel kleiner sind als das Auflösungsvermögen des Systems, experimentell bestimmen.

Die PSF des Leica TCS 4D Mikroskops wurde mittels eines 100nm Grössenstandards (3.2.3) gemessen und mit der PSF verglichen, die theoretisch für konfokale Mikroskope mit unendlich kleinen Anregungs- und Detektionslochblenden berechnet wurde.

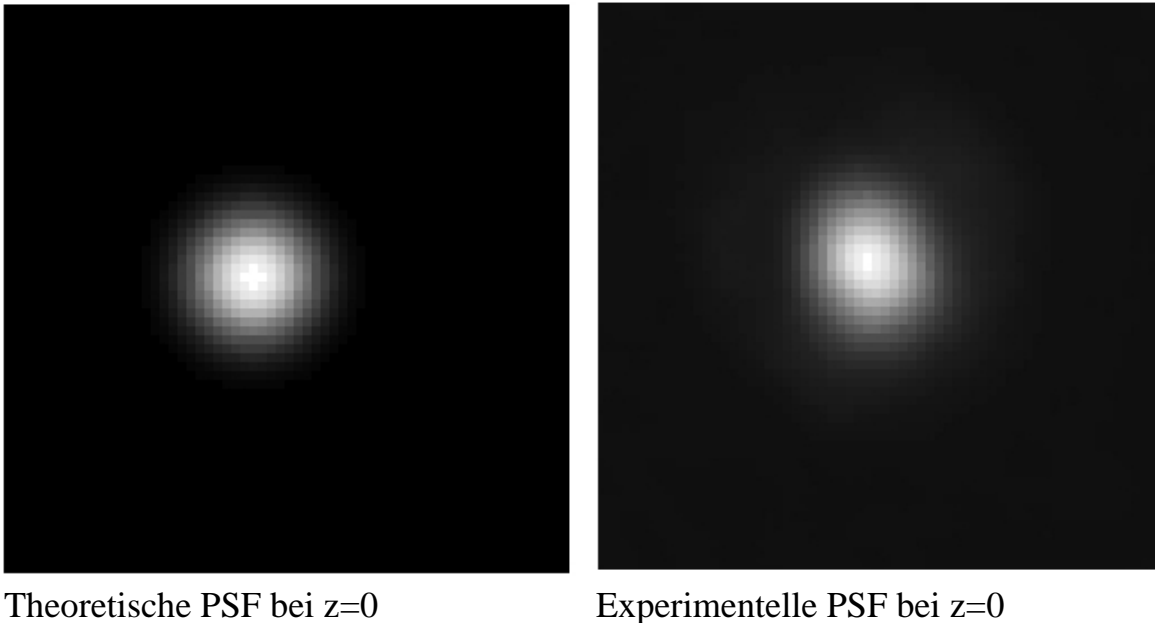
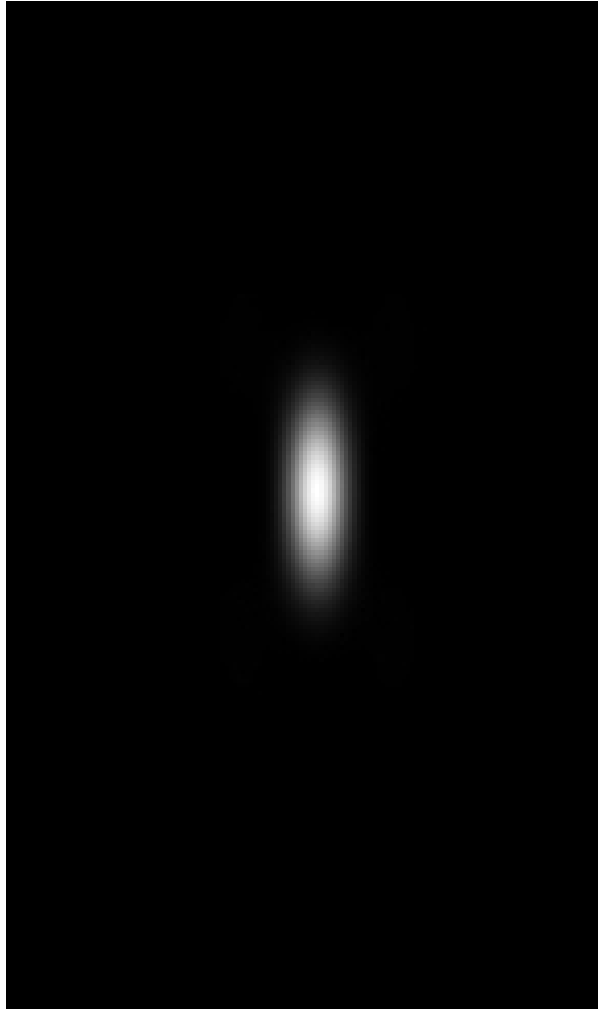


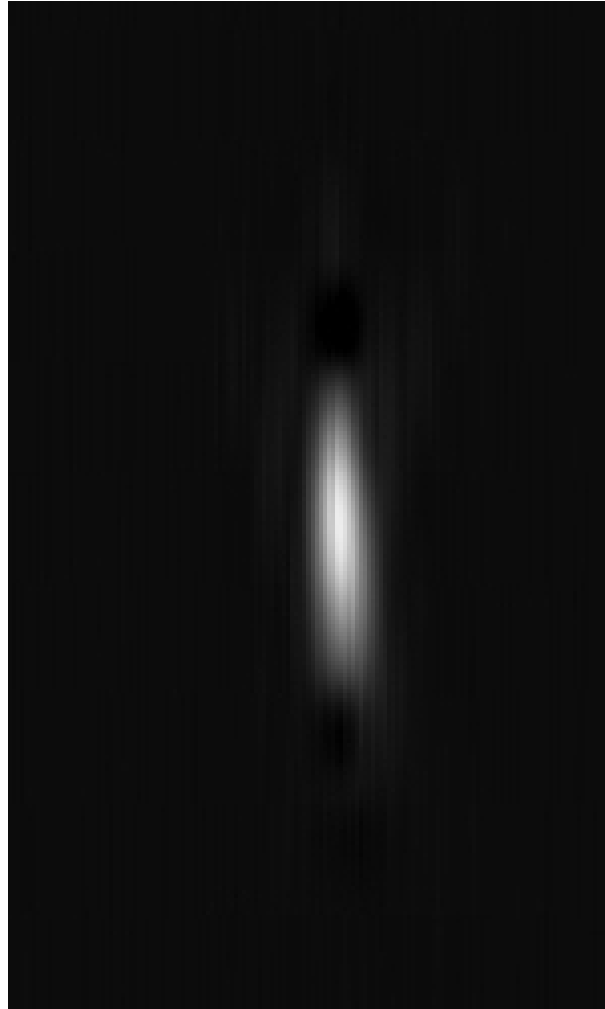
Bild 23: Die Punktverwaschungsfunktion (PSF) in der lateralen Ebene bei $z = 0$ ist aus der theoretischen Beschreibung für eine unendlich kleine Lochblende berechnet und links dargestellt worden. Das rechte Bild stellt die experimentell bestimmte PSF dar. Beide Bilder zeigen einen Ausschnitt der Größe $1 \times 1 \mu\text{m}$.

Bei Auswahl der Größe des Standardbeads stellt die Fluoreszenzausbeute eine Beschränkung nach unten dar. Unter den geforderten Mikroskop-Einstellungen sollte das Bead den Dynamikbereich des Systems möglichst gut ausnutzen. Dies gelingt mit dem verwendeten Standard zwar nicht ganz, jedoch sind größere Standards nicht mehr akzeptabel.

Berechnet wurde die PSF für Punktlichtquellen mit der Charakteristik des FITC-Fluoreszenzfarbstoffes (Emission bei $520nm$) und einer Anregung bei $488nm$, da diese Information für die Rekonstruktion der Chromosomendomänen eine Rolle spielt. Diese sind mit einer FITC-markierten Sonde hybridisiert worden.



Theoretische PSF bei $y=0$



Experimentelle PSF bei $y=0$

Bild 24: Die Punktverwaschungsfunktion (PSF) im axialen Schnitt bei $y = 0$ ist aus der theoretischen Beschreibung für eine unendlich kleine Lochblende berechnet und links dargestellt worden. Das rechte Bild stellt dem die experimentell bestimmte PSF gegenüber. Beide Bilder zeigen einen Ausschnitt der Größe $2.8 \times 4.8 \mu m$.

Das Auflösungsvermögen (Die Halbwertsbreite, HWB) ist an zehn Aufnahmen der PSF bestimmt worden und in der nachstehenden Tabelle notiert.

	Lateral:	Axial:
Experimentell:	$135nm$ ($\sigma = 25.4nm$)	$405nm$ ($\sigma = 29.3nm$)
(Theoretisch:	$150nm$	$292nm$)

Tabelle 5: Die theoretische, laterale HWB der Punktübertragungsfunktion liegt grade noch in der Standardabweichung der experimentell bestimmten Auflösung. Aufgrund der relativ weiten Öffnung des Detektionspinholes verschlechtert sich das axiale Auflösungsvermögen des LSM deutlich.

Die theoretisch zu erwartenden Auflösungen $HWB_{lateral}$ und HWB_{axial} in der lateralen Ebene bzw. in der axialen Richtung sind mit der numerischen Apertur $NA = n \sin \alpha$ wie folgt zu berechnen:

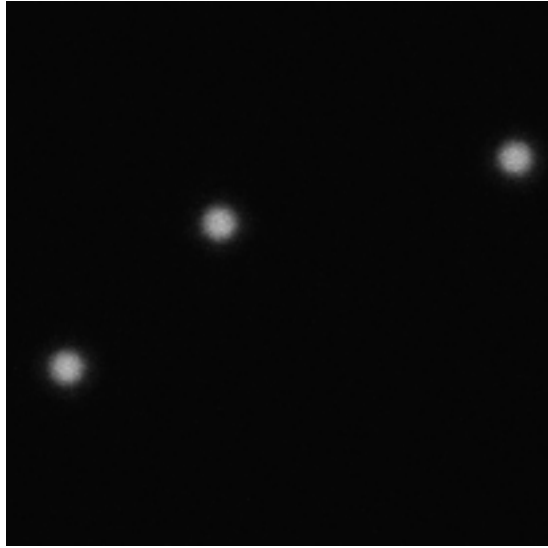
$$HWB_{lateral} = \frac{0.4\lambda}{NA} \quad (4.1)$$

und

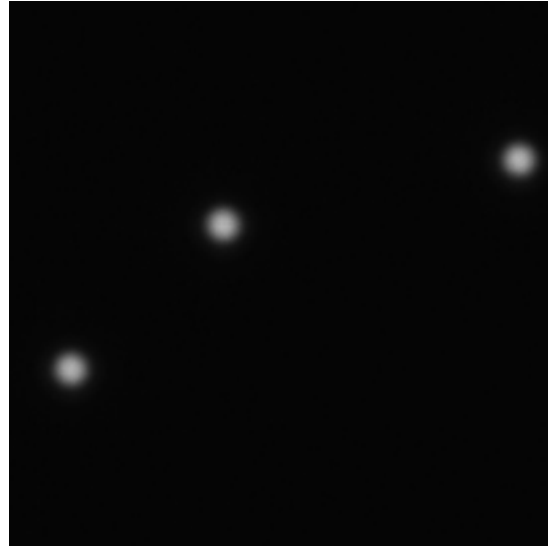
$$HWB_{axial} = \frac{0.45\lambda}{n(1 - \cos \alpha)} . \quad (4.2)$$

4.2.3 Chromatische Abberation

Die Auswertung der Interphasechromosomen erfordert eine parallele Aufnahme des Sondensignals (grüne Emission) und der DNA-Färbung (rote Emission). Es muß sichergestellt sein, daß beide Aufnahmen deckungsgleich sind, da das DNA-Signal durch das segmentierte Sondensignal zum Zwecke der DNA-Quantifizierung ausmaskiert wird. Die Überprüfung erfolgt mit Hilfe der *TetraSpeck*-Beads, die Fluoreszenzen in den betreffenden Spektralbereichen zeigen (Bild 25).



Aufnahme der grünen...



...und der roten Emission

Bild 25: Die gezeigten Aufnahmen der grünen (links) und der roten (rechts) Fluoreszenz dreier Beads sind parallel gemacht worden, um die chromatische Abberation zu bestimmen. Der ITS-Algorithmus legte für diese Bilder die Schwellenwerte 60 und 64 fest.

Die Beads wurden mit einem globalen Schwellenwert, der durch den *Iterative Threshold Selection Algorithmus* ITSA bestimmt wurde, segmentiert und die Differenz der Massenschwerpunkte in den jeweils korrespondierenden Segmenten beider Aufnahmen wurde statistisch ausgewertet.

Über 10 Szenarien mit durchschnittlich jeweils drei Beads ergab sich eine mittlere Abweichung der Schwerpunkte von 0.09 Voxeln bei $\sigma = 0.08$. Somit ist diese Fehlerquelle zu vernachlässigen.

4.2.4 Die RMS in Abhängigkeit vom Grauwert

Der erfolgreiche Einsatz vieler Restaurationsverfahren, u.a. auch des Wiener Filters, stellt bestimmte Anforderungen an das Bildrauschen. Die RMS (Formel 3.4) kann natürlich auch für kleine Bildbereiche berechnet werden, in denen aufgrund der Verschmierung der PSF ein konstanter Grauwert angenommen wird. Dies erlaubt es, ggf. eine Abhängigkeit des Rauschens von den Grauwerten zu finden. Es wurden nun die durchschnittlichen Grauwerte aller Pixel von 30 Aufnahmen des Laserscanning Mikroskops bezüglich ihrer RMS ausgewertet. In Bild (26) ist die RMS eines kleinen Bildbereiches (Kreisscheiben mit Radius 2 Voxel, der Bereich entspricht also etwa $250nm^2$) gegen den mittleren Grauwert aufgetragen.

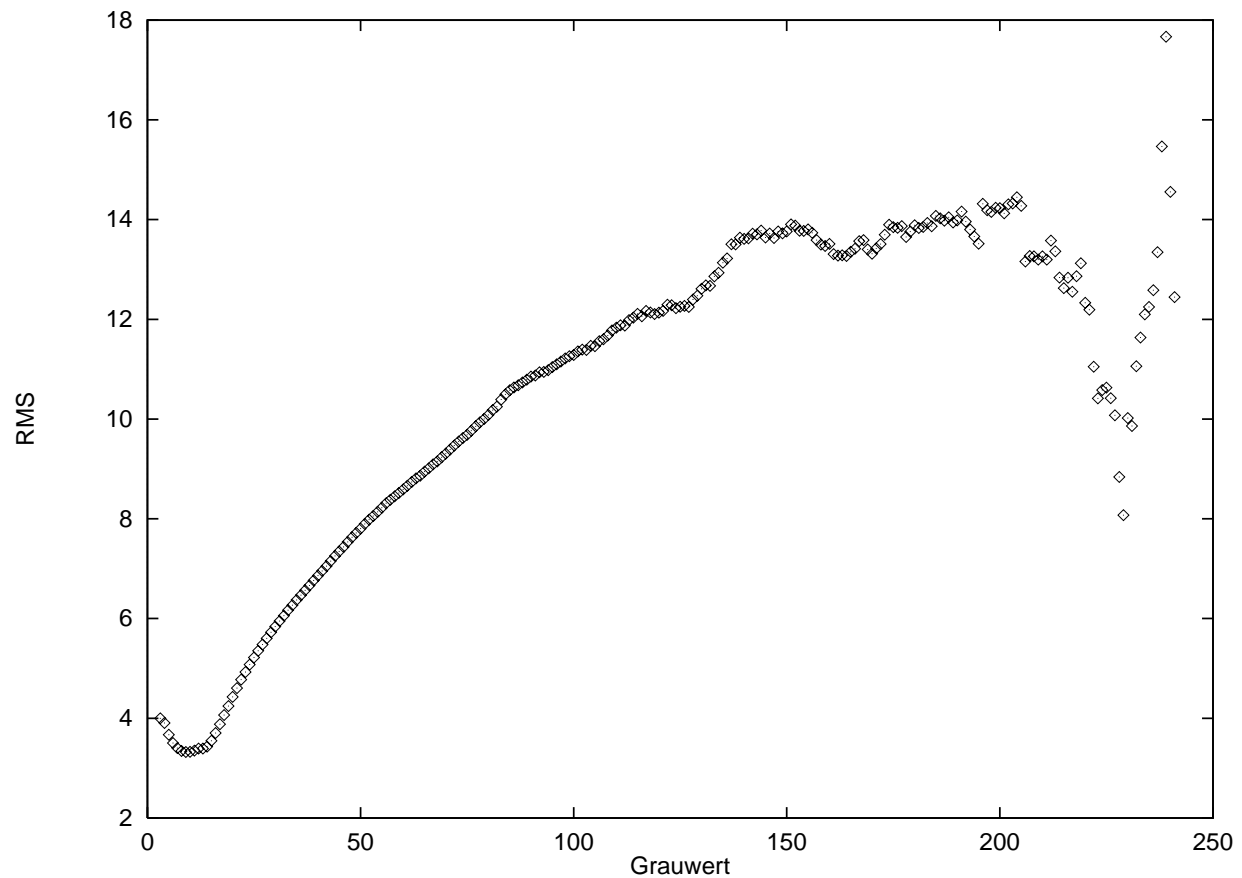


Bild 26: Für je 13 im Kreis angeordnete Bildelemente ist die RMS und der mittlere Grauwert berechnet und gegeneinander aufgetragen worden. Über gleiche Grauwerte in den 30 ausgewerteten Bildern wurde gemittelt. Die geringe Dichte bei den Grauwerten ab etwa 200 reflektiert das seltene Auftreten von Voxeln dieser relativen Intensität.

Das Resultat zeigt, daß man es beim Leica TCS 4D Laserscanner mit nicht-additivem Rauschen zu tun hat.

4.2.5 Die Verteilung des Rauschens

Untersuchungen an unterschiedlichen, mittleren Grauwerten haben gezeigt, daß das Rauschen im wesentlichen normalverteilt ist. Hierzu wurde wieder durch Filterung ein Mittelwertbild erzeugt und vom Originalbild abgezogen, um die Rauschpixel zu erhalten. Es wurden 30 Bilder von FISH-präparierten, humanen Lymphozyten ausgewertet und über diese Histogramme gemittelt. Bild 27 zeigt die Verteilung für den Grauwert 60, der insgesamt 179 mal im Mittelwertbild gefunden wurde.

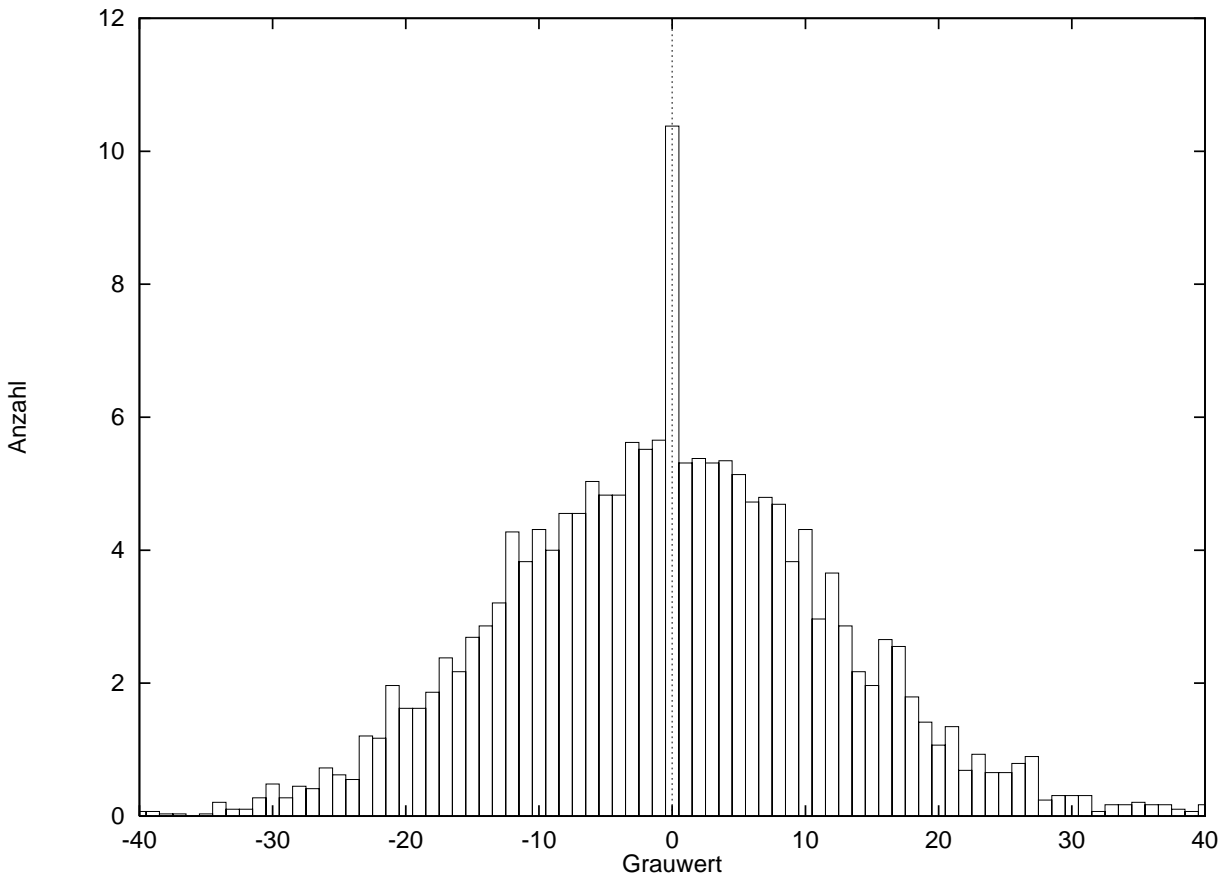


Bild 27: Die Verteilung des Rauschens ist hier für den Grauwert 60 gezeigt, der 179 mal gemessen wurde und in etwa 10 Fällen mit dem korrespondierenden Grauwert im Mittelwertbild übereinstimmt.

Der Peak bei Null zeigt, daß pro Bild etwa¹² 10 mal der Grauwert 60 sowohl im Mittelwertbild als auch im gemessenen Bild gefunden wurde. Er stellt eine Abweichung von

¹² Die Fallzahl ist keine ganze Zahl, da es sich um einen Mittelwert handelt.

der Normalverteilung dar, die vermutlich in nichtlinearen Effekten in der Rauscherzeugung begründet ist. Wenn das Auftreten von Rauschen einer binären Funktion f gehorcht und g die Stärke dieses Rauschens bestimmt, so ist für die Abweichung Δ des Meßwertes vom Mittelwert das Produkt

$$\Delta = f g \quad (4.3)$$

zu erwarten. Die *geschätzte Wahrscheinlichkeit* des Auftretens eines nicht-verrauschten Meßwertes läßt sich nun statistisch bestimmen: Der Peak hat die Größe 10.4, die Summe über alle anderen Werte des Histogramms beträgt 61.68, also ist

$$[P(f = 0)] = \frac{10.4}{61.7} \approx 0.17. \quad (4.4)$$

In anderen Worten, etwa 17% aller Messungen des Grauwertes 60 sind rauschfrei.

4.2.6 Fading

Das FITC-Fluorochrom zeigt im Gegensatz zum Propidium-Jodid ein starkes Fading, d.h. die Fluoreszenzintensität läßt mit der Zeit der Bestrahlung nach. Im Mittel emittiert ein solches Molekül 10^4 Photonen während seiner Lebensdauer. Nagelhus (1996) findet in Experimenten, die mit denen in dieser Arbeit durchgeführten vergleichbar sind, daß eine hohe Bestrahlungsintensität bei gleicher Dosis (hohe Dosisleistung) ein stärkeres Fading erzeugt als geringere Intensitäten. Die notwendige Korrektur ist aber gering und wird hier vernachlässigt.

In humanen Lymphozyten wird mit jeder Messung, unabhängig von der fokalen Ebene, eine Dosis D deponiert, die einen Abbau der Fluorochrome mit

$$f(t) = e^{-\kappa t} \quad (4.5)$$

bewirkt und somit die Intensität I_0 nach der Beleuchtungszeit t auf $I_0 f(t)$ reduziert.

κ läßt sich bestimmen, indem eine Ebene eines fluorochromierten Präparates mehrfach "gescannt" (abgetastet) wird. Da in den weiteren Experimenten 20 Schichten pro Zellkern aufgezeichnet werden, wurde hier eine Ebene 20 mal aufgenommen, um das Fading unter kontrollierten Bedingungen (d.h. der Bildinhalt bleibt qualitativ konstant und ist somit beurteilbar) zu messen.

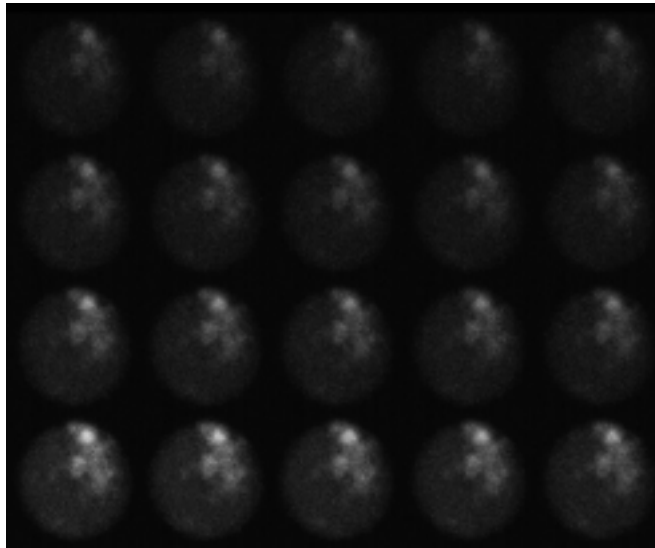


Bild 28: Alle Pixel in den 20 sukzessiv erfolgten Aufnahmen (unten links die Aufnahme bei $t=0$, oben rechts bei $t=19$) wurden ausgewertet, um den Exponenten der Fading-Kurve zu bestimmen. Die Fluoreszenzsignale wurden vorab durch einen Schwellenwert ausmaskiert, um den Hintergrund nicht in die Berechnung einfließen zu lassen.

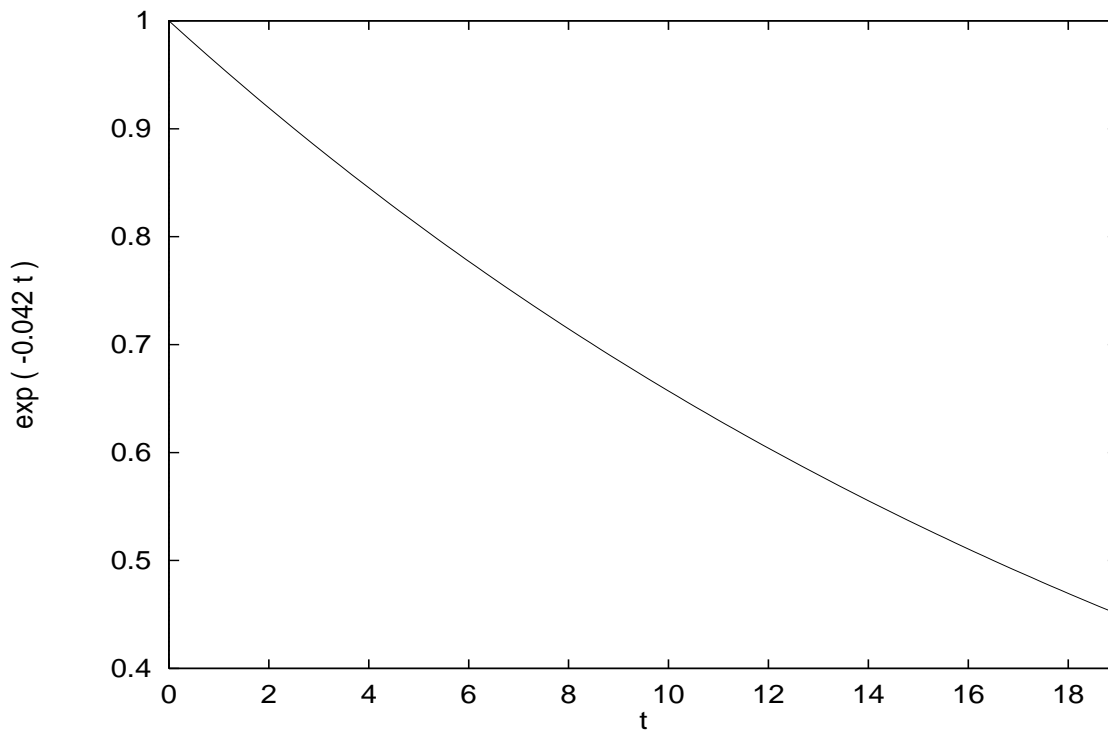


Bild 29: Nach etwa 17 Aufnahmen ist die Anzahl der intakten Fluorochrome auf weniger als die Hälfte abgefallen, wie man in dieser Fading-Kurve ($\kappa = 0.042, \sigma = 0.005$) sehen kann.

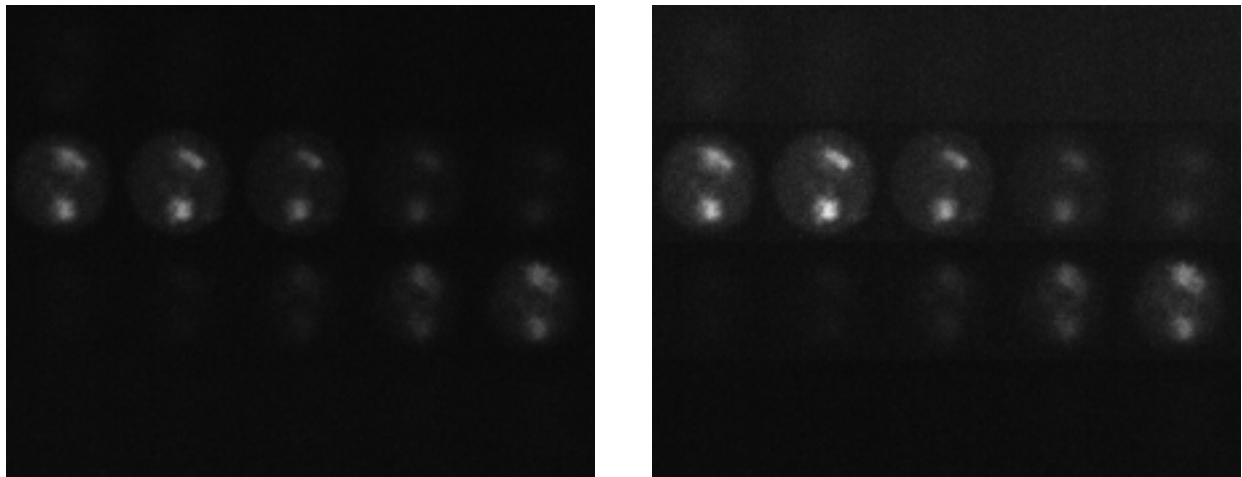


Bild 30: Die 20 Schichtbilder des Kerns mit den hybridisierten Chromosomen 1 (links) sind, von links unten nach rechts oben, zu den Zeiten $t = 0 \dots 19$ aufgenommen und im rechten Bild mit $I_0 = I_t e^{0.042 t}$ korrigiert worden.

Bild 28 zeigt eine Übersicht aller 20 sukzessiv erfolgten Aufnahmen derselben Schicht in einem FISH-präparierten Zellkern. Hieraus wurde für die Fadingkurve, die in Bild 29 gezeigt ist, der Wert $\kappa = 0.042$ ($\sigma = 0.005$) experimentell bestimmt.

Die Aufnahmezeiten der Bilder, die für die Bestimmung des Exponenten κ benötigt wurden, fallen auch bei den Aufzeichnungen der Bilder in unterschiedlichen Ebenen an (d.h. bei Aufnahme von Bildstapel, die der Korrektur bedürfen), so daß die Vergleichbarkeit auch in dieser Beziehung gewährleistet ist.

Die Halbwertsbreite beträgt $-\ln 0.5/\kappa \approx 16.5$, d.h. daß nach der 17en gescannten Schicht aus dem Zellkern die Anzahl der intakten Fluorochrome auf weniger als die Hälfte reduziert wurde. Bild 30 zeigt die Kompensation des Fadings am Beispiel eines FISH-präparierten Lymphozytenkerns. Man erkennt, daß die Fading-Korrektur auch den Hintergrund anhebt. Bei den entsprechenden Voxeln handelt es sich offensichtlich um das Rauschen bzw. dem ungefärbten Hintergrund, der nicht vom Fading betroffen ist.

4.3 Filterung der Punktverwaschungsfunktion

Die folgenden Restaurationsexperimente sind mit der experimentell bestimmten und Median-gefilterten PSF durchgeführt worden. Als Bildmaterial diente eine Aufnahme eines Lymphozytenkerns mit den FISH-präparierten Chromosomen 1, das in Bild 31 zu sehen ist. Das Signal/Rausch-Verhältnis dieser Aufnahme ist $SNR = 3.93$.

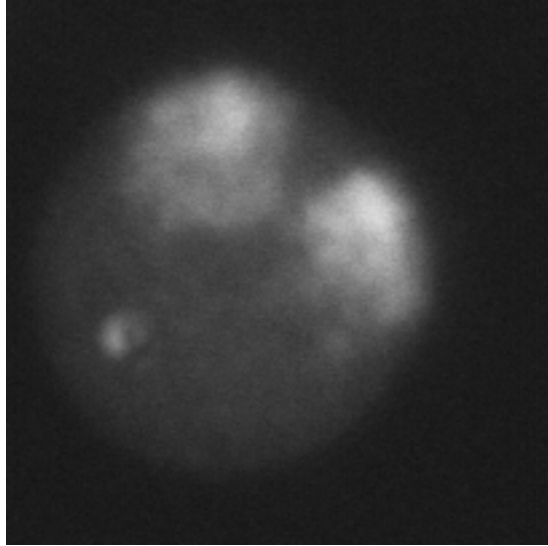


Bild 31: An diesen FISH-präparierten Chromosomen sind die unterschiedlichen Filter ausprobiert worden. Zu sehen ist die Summe aller 20 Schnittbilder, die durch Addition der axial übereinanderliegenden Pixel zustandekommt.

4.3.1 Das inverse Filter

Die Implementierung des inversen Filters (2.2.3.2.1) auf einem Computer ist zwar leicht durchführbar, die Resultate sind jedoch ernüchternd (Bild 32).

Insbesondere die hohen Frequenzen des Rauschens sind in der OTF S (die Fouriertransformierte der PSF s) entweder gar nicht oder nur mit einer geringen Amplitude vorhanden, so daß die entsprechenden Terme $O(u,v) = I(u,v)/S(u,v)$, wobei u, v die Raumfrequenzen sind, “explodieren”, d.h. $O(u,v) \rightarrow \infty$.

Als Alternative bietet sich das Entfernen derjenigen Frequenzen aus dem Resultat der Entfaltung an, die in der Übertragungsfunktion, also der OTF, “kleine” Amplituden besitzen. Bild 33 zeigt ein Beispiel.

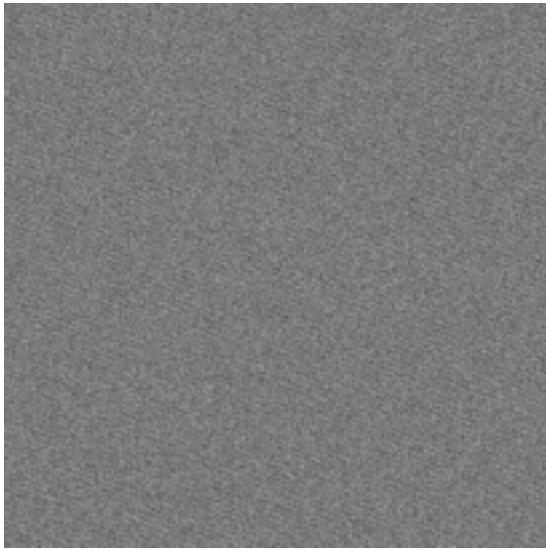


Bild 32: Die direkte Umsetzung der Inversion durch simple Division $O = I/S$ der Spektren schlägt völlig fehl, wie man an diesem rücktransformierten Bild zu sehen ist.

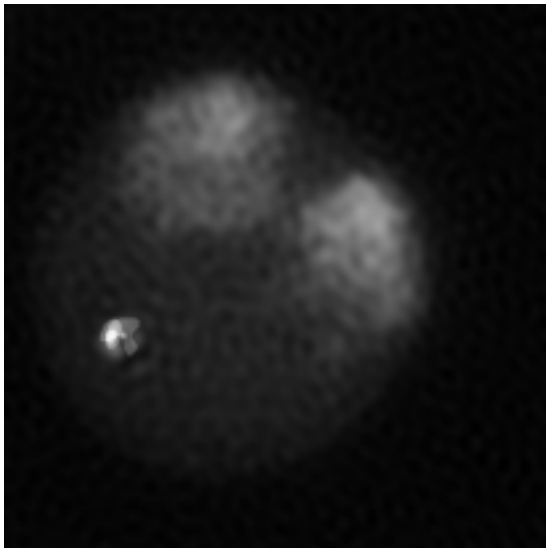


Bild 33: Ein hoher Schwellenwert, der alle hohen Frequenzen eliminiert, führt zu dem gezeigten Resultat, das durch die inverse Fouriertransformation gewonnen wurde.

4.3.2 Das Wiener Filter

Für das Wiener Filter H (2.2.3.2.2) wird, wie bei den Experimenten mit dem inversen Filter, die gemessene und Median-gefilterte PSF verwendet. Zusätzlich werden die Spektren vom Nutzbild und Rauschbild benötigt. Das Nutzsignal (Φ_o) ergibt sich aus dem mediangefilterten Bild. Das Rauschsignal (Φ_n) wird aus der Differenz zwischen dem aufgezeichneten Bild und dem Nutzsignal erzeugt. Wie es bereits bei dem inversen Filter der Fall war, muß auf Nullstellen im Nenner geachtet werden. In einer Implementation kann dieses Problem wieder gelöst werden, indem H an den entsprechenden Frequenzen zu Null gewählt wird.

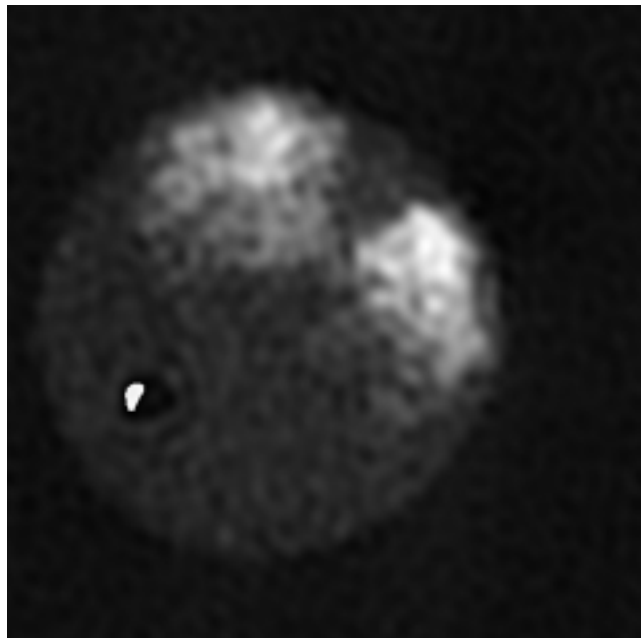


Bild 34: Auch das Resultat des Wiener Filters sieht “artifiziell” aus. Es wurde die gemessene und tiefpaßgefilterte PSF benutzt.

Bild 34 zeigt das Ergebnis des Wiener Filters, angewandt auf den in Bild 31 gezeigten Kern. Die Abhängigkeit des Rauschens von der Fluoreszenzintensität macht sich hier im inversen Signal/Rausch-Verhältnis bemerkbar.

4.3.3 Das ICTM Filter

Wie man in Bild 35 sehen kann, wirkt das ICTM-Filter als Rauschfilter. Die hohen Ortsfrequenzen sind aus dem Bild eliminiert worden.

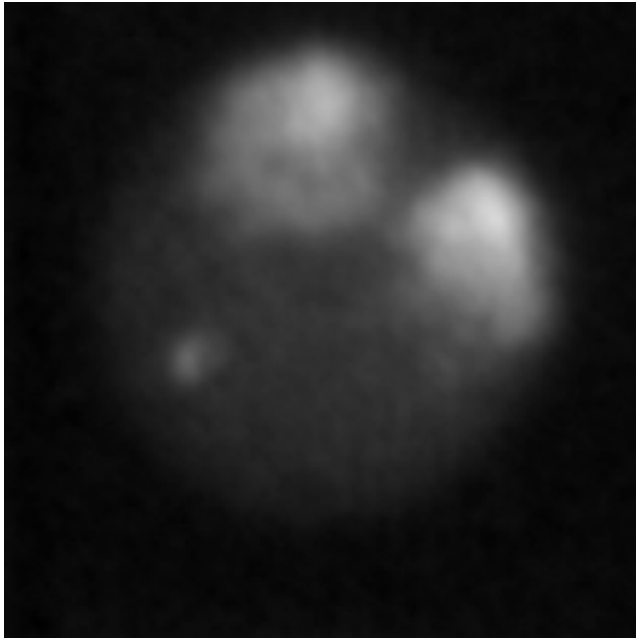


Bild 35: Das Ergebnis des ICTM-Filters zeigt eine starke “Verschmierung” des Bildes.

Offensichtlich gelingt dem parameterfreien ICTM-Filter keine plausible Bildrestauration. Die hohen Raumfrequenzen scheinen vollständig aus dem Bild eliminiert worden zu sein. Der Quelltext des “C”-Programms, das dieses Resultat lieferte, ist freundlicherweise durch Verveer und Jovin¹³ (1997) zur Verfügung gestellt worden.

¹³ Abteilung für Molekularbiologie, Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen

4.4 Segmentierer

4.4.1 Der rekursive Segmentierer “RAWS”

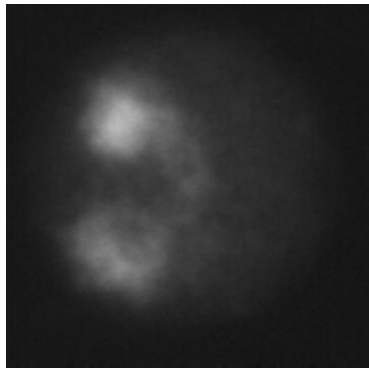
4.4.1.1 Hintergrund

Der relative DNA-Gehalt der hybridisierten Chromosomen (4.6.1) kann als Vorwissen benutzt werden, um Chromosomen in Interphase-Zellen zu segmentieren. Es wird dann ein Segmentierer erforderlich, der diese Information sinnvoll verwerten kann. Ein Parameter des Verfahrens soll dementsprechend “kontinuierlich”¹⁴ einzustellen sein, so daß der segmentierte Anteil der DNA genau dem erwarteten Wert entspricht. Im Falle der hybridisierten Chromosomendomänen ist eine Übereinstimmung jedoch keine Garantie für eine korrekte Segmentierung, da es aufgrund unspezifischer Fluoreszenz keine eindeutige Zuordnung zwischen gemessener Intensität und Zugehörigkeit zu Chromosom 1 gibt.

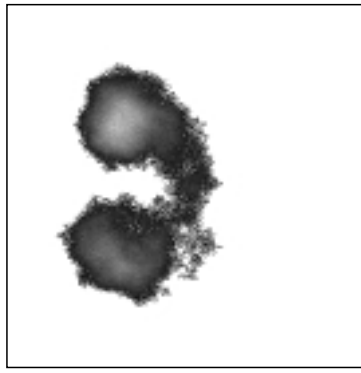
Ein Beispiel soll dies illustrieren: Für den Segmentierer mit globalem Schwellenwert t ist ein Wert $t = 52$ für eine bestimmte Zelle (Bild 36 links) gefunden worden, so daß der *gemessene* DNA-Gehalt in zwei zusammenhängenden Gebieten (die als Chromosomendomänen 1 vermutet werden), bei etwa 10% liegt (um dem Vorwissen zu genügen). Ein Segmentierer, der jedes Bildelement \mathbf{x}_i mit dem Grauwert $I(\mathbf{x}_i) > t$ *ohne Beachtung der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Gebiet* segmentiert, also eine simple Schwellenwertoperation durchführt, findet einen DNA-Gehalt von 13.45%. Diese Erhöhung entsteht durch die Berücksichtigung isoliert liegender Fluoreszenzsignale, die sich nicht in der räumlichen Nähe zu den mutmaßlichen Domänen befinden.

Unter der Bedingung zusammenhängender Chromosomendomänen kann man nun schlußfolgern, daß es außerhalb der betrachteten Chromosomen zu unspezifischen Markierungen durch die Sonde kommt, die im Intensitätsbereich der spezifischen Markierung liegt. Es gibt also kein schwellenwertbezogenes Kriterium für den Ausschluß eines Grauwertes zum hybridisierten Chromosom.

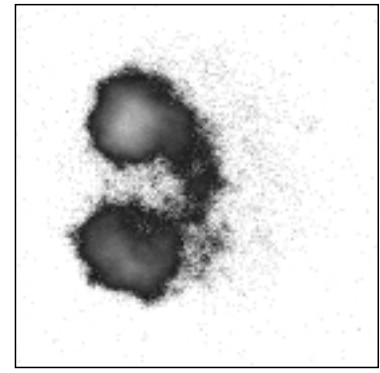
¹⁴ Auf einem Digitalrechner kann kein Parameter kontinuierlich eingestellt werden. Die zur Verfügung stehenden Fließkomma-Zahlen sind aber ausreichend.



Sondensignal



Zusammenhängendes
Gebiet



Schwellenwertbild

Bild 36: Das Chromosomenpaar links ist derart segmentiert worden (mittleres Bild), daß die Summe aller Meßwerte des Propidium-Jodid-Bildes, welche mit den segmentierten Pixeln des FITC-Bildes korrespondieren, einen Anteil an der Gesamtsumme der DNA-Meßwerte von 10.12% ergibt. Führt man dieselbe Schwellenwertoperation ohne die Bedingung zusammenhängender Gebiete aus, so ergibt sich eine Überschätzung des Gehaltes auf über 13%. Alle Bilder sind die Summen der jeweiligen Bildstapel.

4.4.1.2 Der adaptive “Random Walk Segmentierer” RAWS

Neben der Nachbarschaft und der Intensität der segmentierten Bildelemente wird nun ein zusätzlicher Mechanismus eingeführt: Falls eine eindeutige Segmentierung nicht möglich ist, soll während der Segmentierung einem Pixel der Vorzug vor einem anderen gegeben werden, wenn sich jenes in der Nähe besonders heller Regionen befindet. Nach wie vor gilt die Randbedingung, daß das segmentierte Gesamtsignal dem korrekten DNA-Gehalt entsprechen soll.

Der Segmentierer mit Hysterese leistet dies, da er in der Nachbarschaft heller Bereiche seinen Schwellenwert absenken kann. Er ist jedoch durch seine Parametrisierung limitiert. Bei einer Quantisierung in N Grauwerten gibt es $N^2/2$ mögliche segmentierte Gesamtintensitäten. Es soll nun ein Segmentierer vorgestellt werden, der kontinuierlich zu parametrisieren ist und somit eine bessere Approximation des DNA-Gehaltes in den segmentierten Domänen erzielen kann.

Grundlage des Segmentierers ist wieder die Definition zusammenhängender Gebiete (2.2.3.6.1). Auf der Basis eines statischen Schwellenwertes t^s und des Parameters α , der den Einfluß der Nachbarschaft bestimmt, wird nun ein adaptiver Schwellenwert t^a ermittelt, so daß

$$U_j = \{\mathbf{x} \in M \mid I(\mathbf{x}) > t_{j+1}^a\} \quad (4.6)$$

die Menge der für die Zugehörigkeit zur Menge V in Frage kommenden Pixel ist.

Der als Rekursion ausgelegte Segmentierer sammelt wie gehabt nun die Elemente von V , die ebenfalls Elemente von U_j sind. Diesmal jedoch wird diese Menge mit jedem gefundenen Element \mathbf{x}_j von V durch Redefinition des adaptiven Schwellenwertes t_{j+1}^a an die aktuelle Situation angepaßt. Man bestimmt hierfür, um welchen Wert l_{j+1} die bisher gefundenen Bildelemente aus V vom statischen Schwellenwert t^s abweichen. Der Ausdruck

$$l_{j+1} = \sum_{i=1}^j (I(\mathbf{x}_i) - t^s) \quad (4.7)$$

ist ein Maß für die Helligkeit einer Region, wobei $I(\mathbf{x}_i)$ der Grauwert des Bildelementes an der Position \mathbf{x}_i ist. Der adaptive Schwellenwert wird dann zu

$$t_{j+1}^a = t^s - \frac{\alpha l_{j+1}}{j} \quad (4.8)$$

bestimmt.

Der Parameter α bestimmt den Einfluß der j segmentierten Bildelemente auf das Resultat und man kann drei Fälle unterscheiden:

-
- (a) $\alpha = 0$: Es gibt keinen Einfluß und der Segmentierer arbeitet ausschließlich mit dem globalen Schwellenwert t^s ,
 - (b) $\alpha > 0$: In Regionen mit hoher Gesamtintensität werden auch dunklere Bildelemente segmentiert,
 - (c) $\alpha < 0$: In Regionen mit hoher Gesamtintensität überschreitet der adaptive Schwellenwert t^a den statischen Schwellenwert t^s .
-

α wird durch binäres Suchen bestimmt, nachdem t^s optimal eingestellt wurde.

4.4.1.3 Nachbarschaftserhaltung

Ein Segmentierer, der das Bild in einer Vorzugsrichtung abtastet, führt lokal stets mit maximaler "Geschwindigkeit" (Voxel/Iteration) ($\mathcal{V} = (\mathbf{x}_{j+\Delta} - \mathbf{x}_{j-\Delta})/2\Delta$) vom Schwerpunkt der segmentierten Bildelemente weg, d.h. t_{j+1}^a verliert seinen räumlichen Bezug zur Menge der Bildelemente, die l_j bilden.

Einen brauchbaren Ausweg bietet die Permutation

$$P_j^{26}(\mathbf{a}_i) = \mathbf{a}_{i+j \text{ modulo } 26} \quad (4.9)$$

an, wobei \mathbf{a}_i Elemente einer angeordnete Menge von 26 Richtungsvektoren mit der Randbedingung

$$0 < d_m(\mathbf{0}, \mathbf{a}_i) \leq 3 \quad (4.10)$$

darstellen (d_m ist der Abstand in der Manhattan-Metrik). Wenn diese Menge eine zyklische Differenzenmenge bildet, so stellt P^{26} einen Generator dar (*Pseudo Random Generator*), der einen in diesem Kontext als isotrop und nachbarschaftserhaltend bezeichneten Weg ermöglicht. Bild 37 illustriert dies.

Das dreidimensionale Bild

$$I(\mathbf{r}) = \begin{cases} \frac{1}{|r|} & \text{für } r \geq 1 \\ 1 & \text{für } r < 1 \end{cases} . \quad (4.11)$$

wurde hier mit globalem Schwellenwert (Links), adaptivem Schwellenwert mit Vorzugsrichtung der Rekursion (Mitte) sowie einem adaptiven Schwellenwert mit Permutation (Rechts) segmentiert. Tatsächlich reproduziert der “Random Walk” Operator nicht exakt die Kreisform, die zu erwarten gewesen wäre. Das Resultat ist aber verbessert.



Bild 37: Binrisierte Schnitte der dreidimensionalen Funktion (4.11). Von links nach rechts sind ein statischer Schwellenwert mit $\alpha = 0$ und ein adaptierter Schwellenwert mit $\alpha = 2$ mit Vorzugsrichtung des Operators sowie mit “Random Walk” Operator angewandt worden. Um den negativen Effekt zu verdeutlichen, ist α mit Absicht sehr hoch gewählt worden. Im rechten Bild scheinen einige Punkte keine Konnektivität zu haben. Diese ist jedoch räumlich gegeben und im Schnittbild nicht zu sehen.

Bei der Segmentierung wird nun folgendermaßen vorgegangen: Der statische Schwellenwert t^s wird so eingestellt, daß sich mit $\alpha = 0$ eine, bezogen auf die Gesamtintensität im Zellkern, relative Gesamtintensität der maskierten Domänen von $I_G \leq 10.12\%$ ergibt. α kann nun kontinuierlich so verändert werden, daß I_G weiter verbessert, d.h. in Richtung

10.12% verschoben wird. Bild 38 zeigt die Anwendung auf die Chromosomendomänen eines Lymphozyten. Mit dem statischen Schwellenwert $t^s = 52$ und $\alpha = 0$ ergibt sich der relative DNA-Gehalt zu 9.68%. Eine Schicht aus dem Bildstapel der Segmente ist links zu sehen. Bei $t^s = 51$ gab es eine Überschätzung mit 10.14%. Erst die Einstellung $\alpha = 0.104$ lieferte Segmente mit dem geforderten DNA-Gehalt von 10.12%. Das Ergebnis dieser Segmentierung ist, wieder am Beispiel eines Schichtbildes, rechts gezeigt.

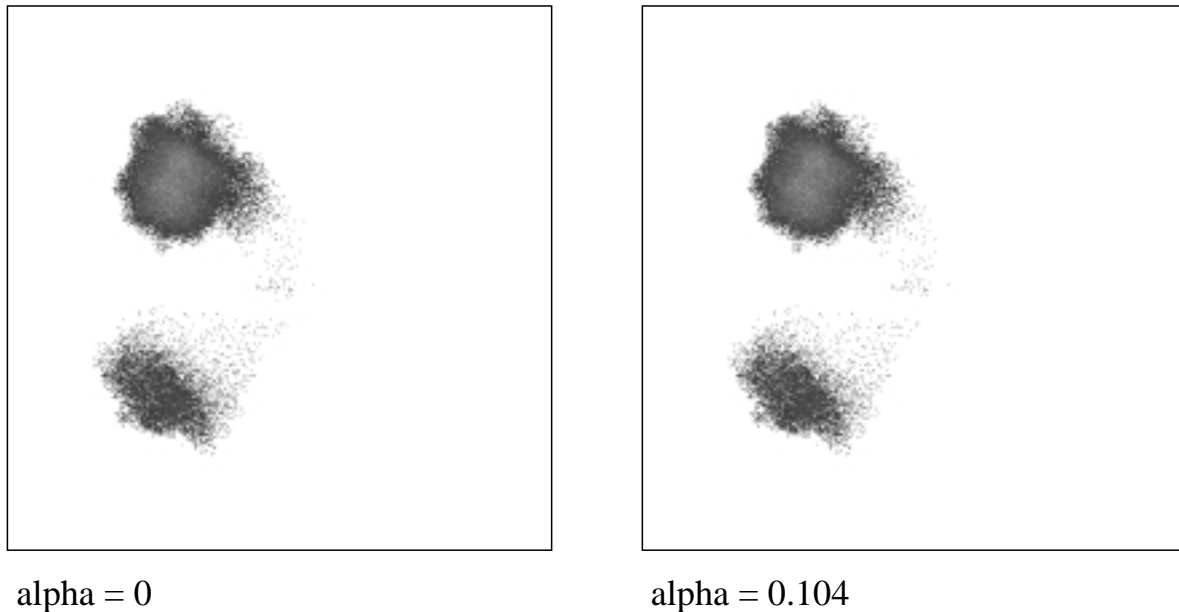


Bild 38: Ein Schnitt aus dem Bildstapel des den DNA-Gehalt leicht unterschätzenden Segmentes ($\alpha = 0$) ist dem durch Adaption mit $\alpha = 0.104$ korrigierten Schnitt gegenübergestellt. In beiden Fällen lag der statische Schwellenwert bei $t^s = 52$. Der Einfluß dieses Steuerparameters α ist visuell kaum zu erkennen.

Der visuelle Unterschied ist minimal, das Volumen beider Domänen ergibt in der Summe ein um etwa 4.8% gestiegenen Wert von $15.43\mu m^3$ für den RAWs-Algorithmus.

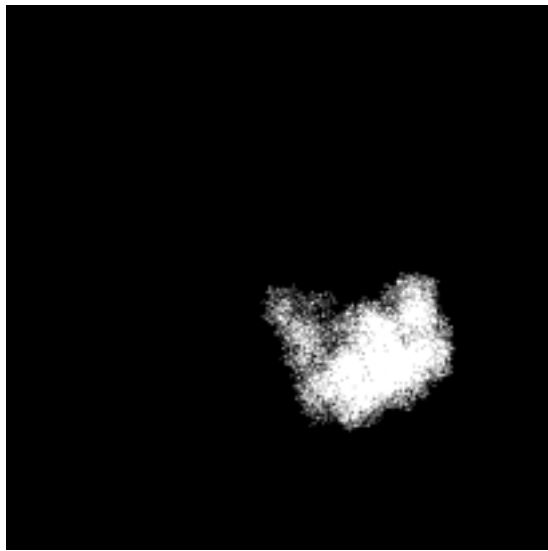
4.4.2 Vor- und Nachbehandlungen

4.4.2.1 Vorwissen über die Morphologie nutzen

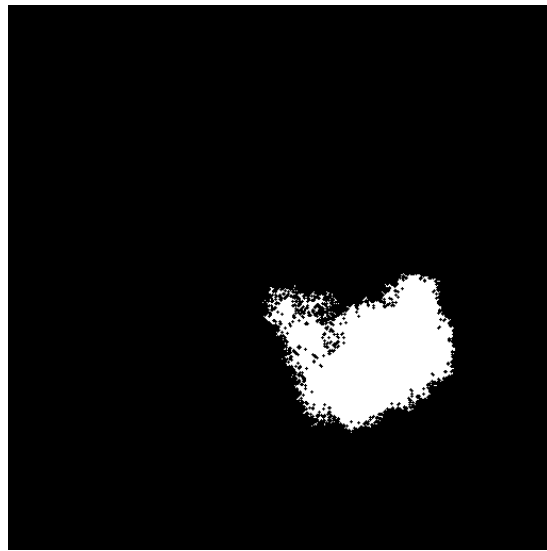
Innerhalb der segmentierten Domänen treten “Löcher” auf, nicht-segmentierte Bildelemente also, die durch die Domänen umschlossen sind. Diese Voxel sind dem Vorwissen über integrale Territorien nach keinem anderen Chromosom als dem tatsächlich hybridisiertem zuzuordnen. Das Auftreten dieser Löcher wird zur Oberfläche der Domäne hin häufiger, was möglicherweise auf den Kontakt mit angrenzenden Chromosomen zurückzuführen ist. Gegenüber diesen ist eine Nichtbeachtung der inneren Löcher problematisch, da in diesem Falle die Gefahr einer Unterschätzung des Volumens besteht.

4.4.2.2 Closing

Ein Verfahren, um diese Löcher zu schließen, ist die Anwendung des Closing-Operators aus der Mathematischen Morphologie (2.2.3.3.2), dessen Anwendung Bild 39 zeigt. Selbst mit dem kleinsten Strukturelement, welches immerhin die inneren Löcher zu schließen vermag, steigt das segmentierte Volumen im äußeren Bereich.



Originalbild



Einfaches Closing mit $r=1$

Bild 39: Ein dreidimensionales Closing mit einem kugelförmigen Strukturelement vom Radius 1 ist auf den binären Bildstapel, aus dem links eine Schicht zu sehen ist, angewandt worden. Das Ergebnis, rechts, zeigt, daß die meisten Löcher im Inneren der Domäne geschlossen werden konnten, jedoch ebenfalls ein Auffüllen im äußeren Bereich.

4.4.2.3 Tiefpaßfilterung

Löcher, die durch das Rauschen zustande kommen, können durch eine Tiefpaßfilterung des Bildstapels vor der Segmentierung geschlossen werden. Bild 40 zeigt die Anwendung einer Konvolution mit einem $3 \times 3 \times 3$ Kernel, wobei alle Elemente des Kernels aus Normierungsgründen zu $1/27$ gewählt wurden.

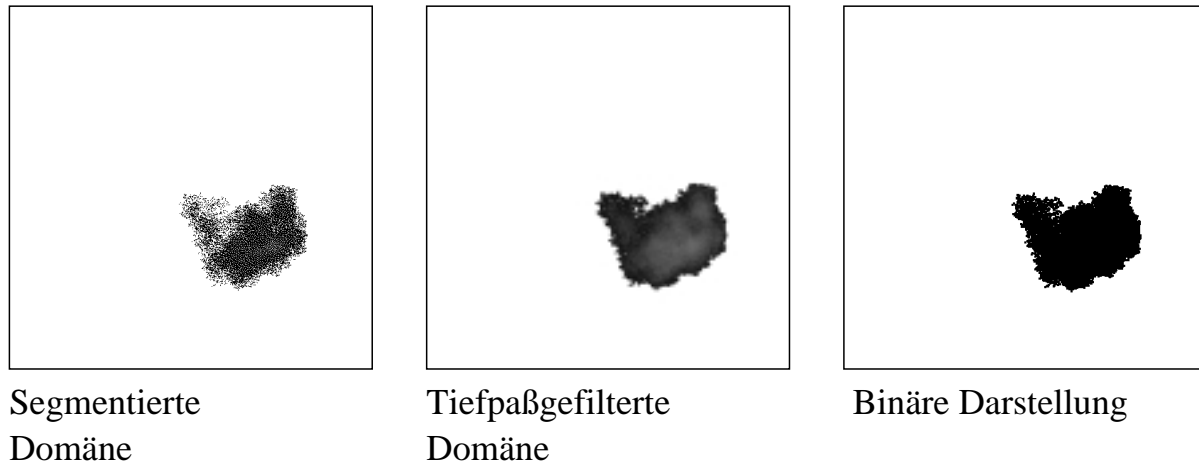


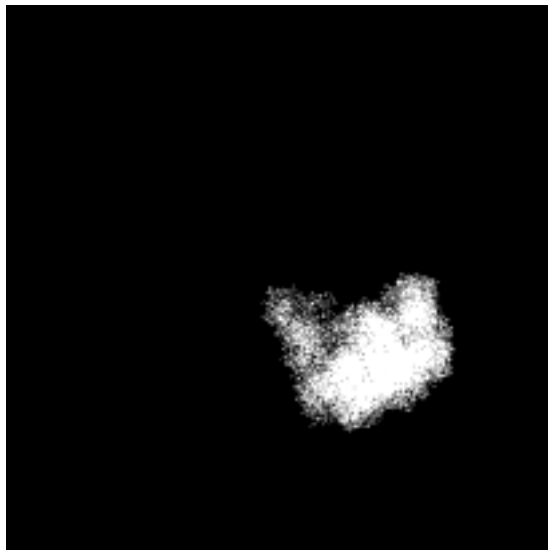
Bild 40: Eine Tiefpaßfilterung ist auf den Bildstapel, aus dem links ein Schnitt nach der Segmentierung zu sehen ist, angewandt worden (mittleres Bild). Das entsprechende Binärbild rechts zeigt eine fast völlig geschlossene Oberfläche, die auf eine Überschätzung des Volumens hindeutet.

Es ist offensichtlich, daß insbesondere dieses Filter die Grenzbereiche der Domäne verwischt, so daß es hier zu einer Überschätzung des Volumens kommen kann.

4.4.2.4 Zellulärer Automat

Zelluläre Automaten (ZA) sind iterative Programme, die auf Bildelemente entsprechend ihrer Nachbarschaft nach definierten Regeln wirken. Disziplinen wie z.B. die Mathematische Morphologie machen sich diese Automaten zu nutze und Entsprechungen des nun vorzustellenden Algorithmus sind dort zu finden.

Ein sehr einfacher ZA ist entwickelt worden, um die Löcher innerhalb der Domänen zu schließen: Im Binärbild eines Segmentes wird für jedes nicht gesetzte Voxel überprüft, wieviele Nachbarpunkte gesetzt sind. Wenn ein Wert n erreicht oder überschritten wird, wird das betrachtete Bildelement ebenfalls gesetzt. In dichten Bereichen des Bildes bewirkt dies ein Auffüllen der Strukturen, in weniger dichten Bereichen bleibt das Bild unverändert.



Originalbild



Ergebnis des ZA mit $n=5$

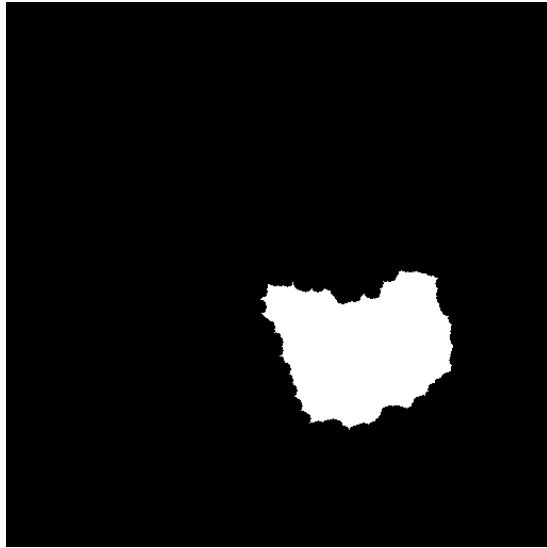
Bild 41: Der binäre Schnitt aus dem Bildstapel der segmentierten Domäne ist mit einem Zellulären Automaten bearbeitet worden. Bereits eine Iteration mit $n = 5$ reichte aus, um das rechts gezeigte Ergebnis zu erzielen.

Bild 41 zeigt den Erfolg des eingesetzten Zellulären Automaten mit $n = 5$ nach nur einer Iteration. Die äußeren Bereiche der Domäne sind weitgehend erhalten geblieben, während der innere Bereich vollständig aufgefüllt wurde.

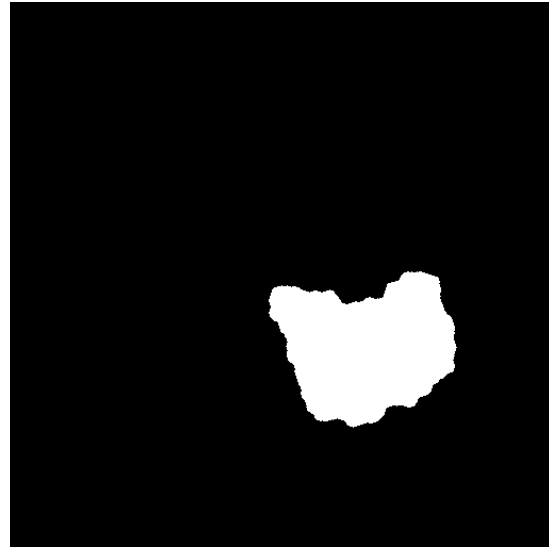
4.4.2.5 Spezielle Nachbehandlung für die Oberflächenschätzung

Die Oberflächenberechnung kann sich aufgrund des geringen Auflösungsvermögens des Mikroskops bezogen auf molekulare Maßstäbe nicht auf die gängigen Definitionen der Chemie stützen. Artifizielle Strukturen unterhalb der HWB sollen keinen Beitrag zur Oberfläche leisten. Nach dieser Definition sollte die Oberfläche der segmentierten Chromosomendomänen geglättet werden. Man macht dies durch sukzessive Anwendung des Closing- und des Opening-Operators mit einem großen Strukturelement auf das Binärbild.

Für die in Bild 41 gezeigte Domäne gibt eine Kugel mit Radius 5 (entspricht etwa $100nm$) als Strukturelement gute Resultate. Bild 42 zeigt die Auswirkungen der beiden Operationen. Das Closing schließt alle Strukturen, hinterläßt aber konkave “Dellen” mit entsprechend spitzen Kanten. Das nachfolgende Opening beseitigt diese.



Closing



Opening

Bild 42: Die Operatoren “Closing” und “Opening” aus der Mathematischen Morphologie sind auf eine segmentierte Domäne sukzessive angewandt worden. Als Strukturelement fand eine Kugel mit dem Radius 5 Pixel ($\approx 100\text{ nm}$) Verwendung. An der gezeigten Schicht aus dem Bildstapel der Resultate ($10 \times 10\text{ }\mu\text{m}$) kann man den Effekt erkennen: Links sieht man, daß nach dem Closing “Spitzen” auf der Oberfläche (bzw. am Rand) entstehen, die das nachfolgende Opening (rechts) beseitigen kann.

4.5 Streuung im Chromatin

Mit dem FDTD-Algorithmus wurde ein qualitativer Vergleich zwischen der Abbildung eines Hertzschen Dipols außerhalb und innerhalb eines Zellkerns angestellt.

4.5.1 Implementierung des Algorithmus

Eine geeignete Datenstruktur (DS) hält das elektrische bzw. magnetische Feld sowie den Brechungsindex an jedem Gitterpunkt des Modells bereit. Die Anzahl der Gitterpunkte (N) ist ein Parameter, der Speicher- und Rechenzeitbedarf der Simulation determiniert und nicht frei wählbar ist. Er ist abhängig von der Größe d der zu modellierenden Struktur sowie der Wellenlänge, die nach dem Stabilitätskriterium

$$\Delta x \leq \frac{\lambda}{10} \quad (4.12)$$

die Wahl der Schrittweite Δx des Modells nach oben einschränkt:

$$N = \frac{d}{\Delta x} \quad (4.13)$$

Das Zellkernmodell gibt eine räumliche Ausdehnung von $10 \times 10 \times 10 \mu m$ vor, Die Wellenlänge λ wird zu $488 nm$ und Δx zu $\frac{\lambda}{10}$ gewählt. Damit sind etwa $8 \cdot 10^3$ Gitterpunkte erforderlich. Licht durchläuft das Modell in y-Richtung in

$$t = \frac{10^{-5}}{c} \quad (4.14)$$

Sekunden, hierfür werden mit

$$\Delta t = \frac{\Delta x}{2c} \quad (4.15)$$

rund 400 Iterationen benötigt.

Statt des Euler-Cauchyschen Polygonzuges wird hier ein Runge-Kutta Verfahren zur Lösung der Maxwell Gleichungen eingesetzt:

$$\hat{\mathbf{f}} = \frac{1}{6}(\mathbf{k}_1 + 2\mathbf{k}_2 + 2\mathbf{k}_3 + \mathbf{k}_4), \quad (4.16)$$

wobei

$$\mathbf{k}_1 = g(\mathbf{f}_t) \quad (4.17)$$

$$\mathbf{k}_2 = g(\mathbf{f}_t + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{k}_1) \quad (4.18)$$

$$\mathbf{k}_3 = g(\mathbf{f}_t + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{k}_2) \quad (4.19)$$

$$\mathbf{k}_4 = g(\mathbf{f}_t + \Delta t \mathbf{k}_3). \quad (4.20)$$

Der Übersichtlichkeit halber sind die Gleichungen mit Differentialoperatoren ausgeführt:

$$\mathbf{k}_1 = \epsilon^{-1} \nabla \times \mathbf{H} \quad (4.21)$$

$$\mathbf{l}_1 = -\mu^{-1} \nabla \times \mathbf{E} \quad (4.22)$$

$$\mathbf{k}_2 = \epsilon^{-1} \nabla \times \left(\mathbf{H} + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{l}_1 \right) \quad (4.23)$$

$$\mathbf{l}_2 = -\mu^{-1} \nabla \times \left(\mathbf{E} + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{k}_1 \right) \quad (4.24)$$

$$\mathbf{k}_3 = \epsilon^{-1} \nabla \times \left(\mathbf{H} + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{l}_2 \right) \quad (4.25)$$

$$\mathbf{l}_3 = -\mu^{-1} \nabla \times \left(\mathbf{E} + \frac{\Delta t}{2} \mathbf{k}_2 \right) \quad (4.26)$$

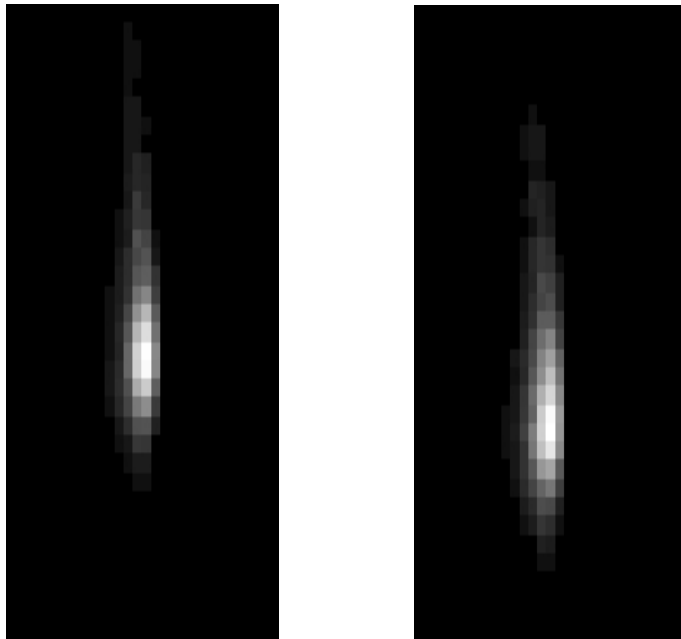
$$\mathbf{k}_4 = \epsilon^{-1} \nabla \times (\mathbf{H} + \Delta t \mathbf{l}_3) \quad (4.27)$$

$$\mathbf{l}_4 = -\mu^{-1} \nabla \times (\mathbf{E} + \Delta t \mathbf{k}_3). \quad (4.28)$$

Ein orthogonales Modell folgt der Manhattan-Norm (auch: 1-Norm), die bekanntlich mit wachsender Auflösung nicht gegen die euklidische Norm konvergiert. Um hieraus resultierende Effekte zu mindern, kann das Modell im Rahmen der Rechnungen einer Tiefpaßfilterung unterzogen werden. Hierzu mittelt man die optische Dichte an jedem Gitterpunkt über den umliegenden Bereich.

4.5.2 Abbildung eines Hertzschen Dipolstrahlers

Bild 43 zeigt, wie ein Dipol mit einer Länge von ca. 100nm durch den Algorithmus abgebildet wird, wenn man ein Objektiv mit dem Öffnungswinkel 60° zum Abtasten einsetzt. Links ist die Lichtausbreitung im Vakuum zu sehen, rechts durchläuft das Licht den Zellkern mit dem Radius $4\mu\text{m}$ und einer optischen Dichte von 1.39. Das Modell ist mit einer Kantenlänge von $10\mu\text{m}$ größer als der Zellkern gewählt worden, um den Einfluß der Reflektionen an den Modellgrenzen auf das Ergebnis gering zu halten. Das umgebende Medium hat die Dichte 1.44. Die Kernmembran wurde aufgrund ihrer geringen Ausdehnung (kleiner als λ) vernachlässigt. Die Bilder sind nicht radialsymmetrisch, da die Dipolachse geneigt wurde. Hierdurch sind numerische Probleme bei der Berechnung vermieden worden. Außerdem streckt die endliche Ausdehnung des Dipols die Abbildung.



Ausbreitung im Vakuum... und im Chromatin

Bild 43: Die Bilder zeigen einen Ausschnitt der Abbildung des Dipolstrahlers. Die Breite ist $1\mu\text{m}$.

Die Ergebnisse lassen keinen wesentlichen Effekt der Streuung erkennen. Man muß jedoch im Auge behalten, daß die Simulation mit den Randbedingungen parametrisiert wurde, die für zweidimensionale FDTD-Algorithmen bestimmt wurden. Aus Gründen der Rechenzeit und des Speicherbedarfs darf man keine allzu großen Erwartungen an die

physikalische Korrektheit des Ergebnisses stellen. Für eine erste Abschätzung sollte das Ergebnis, an dem mit einer Zeitdauer von zwei Tagen gerechnet wurde, aber ausreichen.

4.6 DNA-Messung in Metaphasechromosomen

4.6.1 Messung der Fluoreszenz in situ hybridisierten Chromosomen

Eine gute Messung des DNA-Gehaltes des Chromosoms 1 ist durch Untersuchung an Metaphase-Chromosomen möglich. Dieses Vorgehen hat gegenüber der Messung in Interphasezellen zwei Vorteile: Zum einen liegen die Chromosomen oft isoliert und sind somit von den unspezifischen Fluoreszenzsignalen auf den übrigen Chromosomen zu trennen. Der gemessene DNA-Gehalt kann dann als a priori-Wissen zum Segmentieren in Interphasekernen verwendet werden. Zum anderen kann der Vergleich mit dem DNA-Gehalt der nicht-hybridisierten Chromosomen 1 gezogen werden. In Bild 44 sieht man in inverser Darstellung eine PJ-gefärbte Metaphase und rechts daneben das Bild der FITC-markierten Chromosomen. Die gute Übereinstimmung des Sondensignals (rechts) mit dem PJ-Bild der Chromosomen (links) zeigt, daß spezifische Sequenzen homogen durch die Sonde markiert wurden. Dies ist insbesondere für die Interphaseuntersuchungen notwendig.

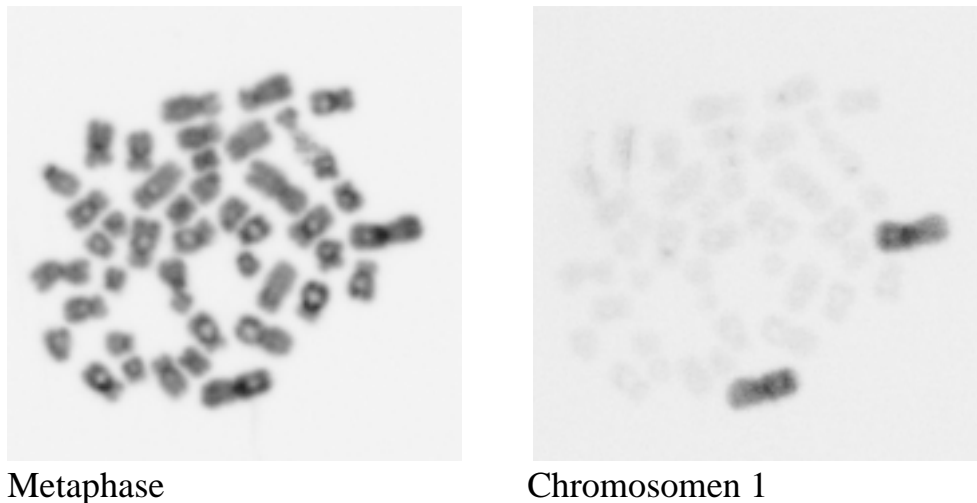


Bild 44: Das linke Bild zeigt die Metaphase-Chromosomen einer humanen Lymphozyten-Zelle. Rechts sind die hybridisierten homologen Chromosomen 1 aus derselben Zelle dargestellt.

Die hybridisierten Chromosomen wurden mit dem Segmentierer mit Hysterese isoliert. Der obere Schwellenwert wurde dabei nach dem ITSA-Verfahren festgelegt und als unterer

Schwellenwert wurde das Maximum im Grauerthistogramm des entsprechenden Bildes angenommen (Bild 45). Die so isolierten Chromosomen dienten als Maske für das Bild der stöchiometrisch (PJ) gefärbten Metaphase. Bild 46 demonstriert das Vorgehen.

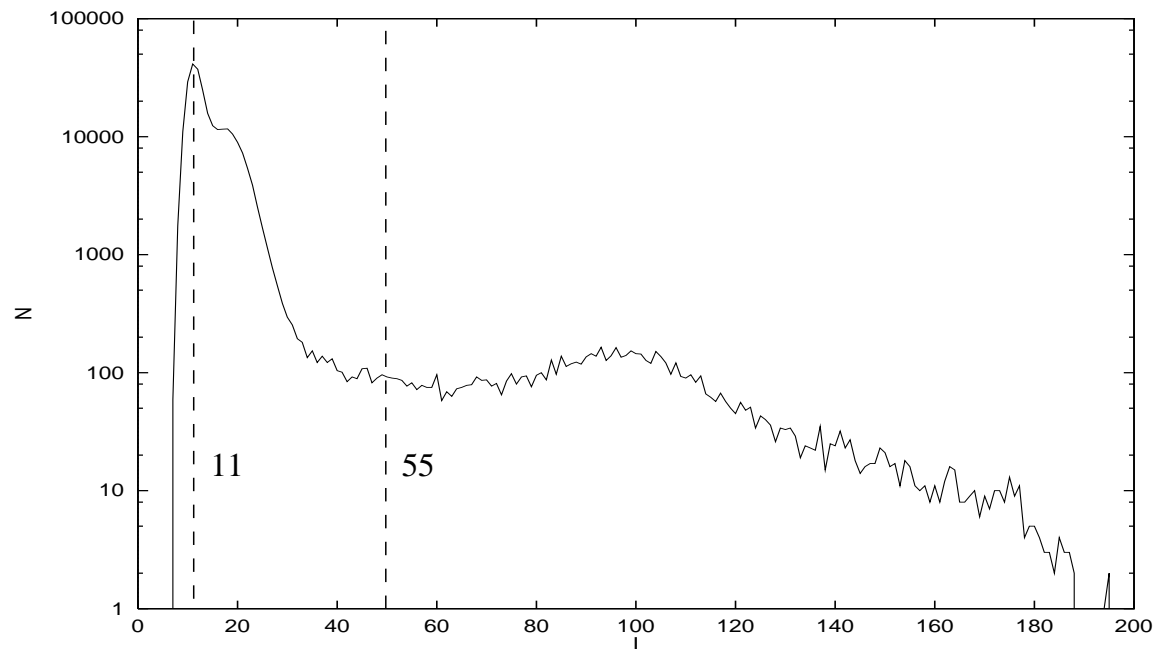


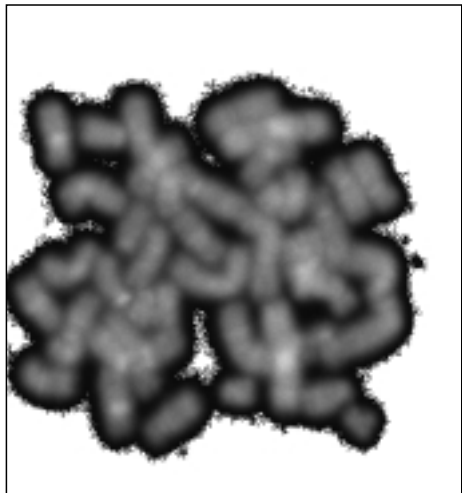
Bild 45: Das Grauerthistogramm der in Bild 46 gezeigten Chromosomenaufnahme in logarithmischer Darstellung. Die vertikalen, gestrichelten Linien zeigen das Maximum des Histogramms (11) und den vom ITS-Algorithmus festgelegten Schwellenwert (55).



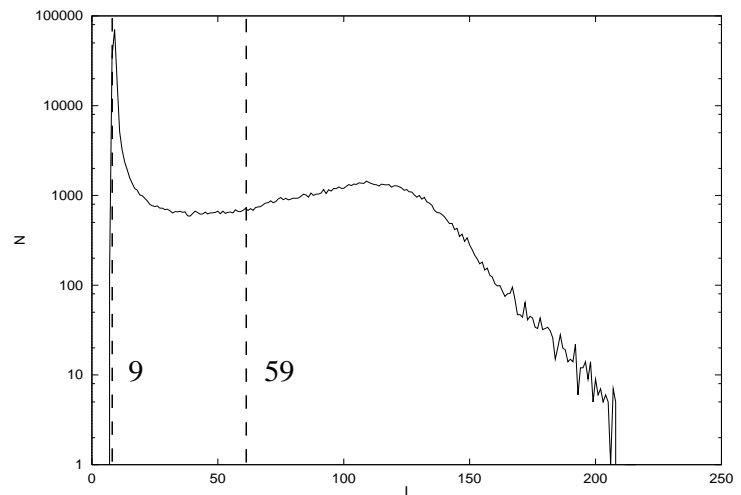
Bild 46: Von links nach rechts: Aufnahme der Fluoreszenz in situ hybridisierten Chromosomen 1, die Segmentierung und die Maskierung mit dem PJ-Bild.

Um den gefundenen DNA-Gehalt auf die gesamte Metaphase zu beziehen, muß diese ebenfalls geeignet segmentiert werden, da der Hintergrund einen Anteil an der Gesamtintensität des Bildes hat.

Bild 47 zeigt die segmentierte Metaphase (das PJ-Bild) zusammen mit ihrem Histogramm. Das Maximum lag in diesem Fall bei Grauwert 9. Dieser Wert wurde als unterer Schwellenwert zur Segmentierung mit Hysterese eingesetzt. Als oberen Schwellenwert legte der iterative Algorithmus ITSA den Grauwert 59 fest. Auf zusammenhängende Gebiete brauchte dabei nicht geachtet zu werden, da die Intensitäten im gesamten Bild aufsummiert wurden.



Segmentierte Metaphase



Histogramm der Metaphase

Bild 47: Der Grauwert mit maximaler Häufigkeit (rechts) in der Propidium-Jodid-gefärbten Metaphase wird zum Segmentieren (links) benutzt. Die segmentierte Metaphase sieht übersegmentiert aus. Tatsächlich ist ihre Fluoreszenz bis in den Hintergrund hinein verbreitert.

4.6.2 Messung der nicht-hybridisierten Chromosomen

Der gefundene, relative DNA-Gehalt der hybridisierten Chromosomen soll mit dem der nicht-hybridisierten Chromosomen verglichen werden. Dazu ist eine Segmentierung der Chromosomen 1 in Metaphasen erforderlich, welche nur mit Propidium-Jodid gefärbt wurden. Zu diesem Zweck sind isoliert liegende Chromosomen notwendig, die sich zweifelsfrei anhand ihrer Morphologie identifizieren lassen (z.B. durch ihre Größe und durch die Lage des Zentromers auf dem Chromosom). Bild 48 zeigt eine Szene, in der nur eines der beiden homologen Chromosomen 1 frei liegt.

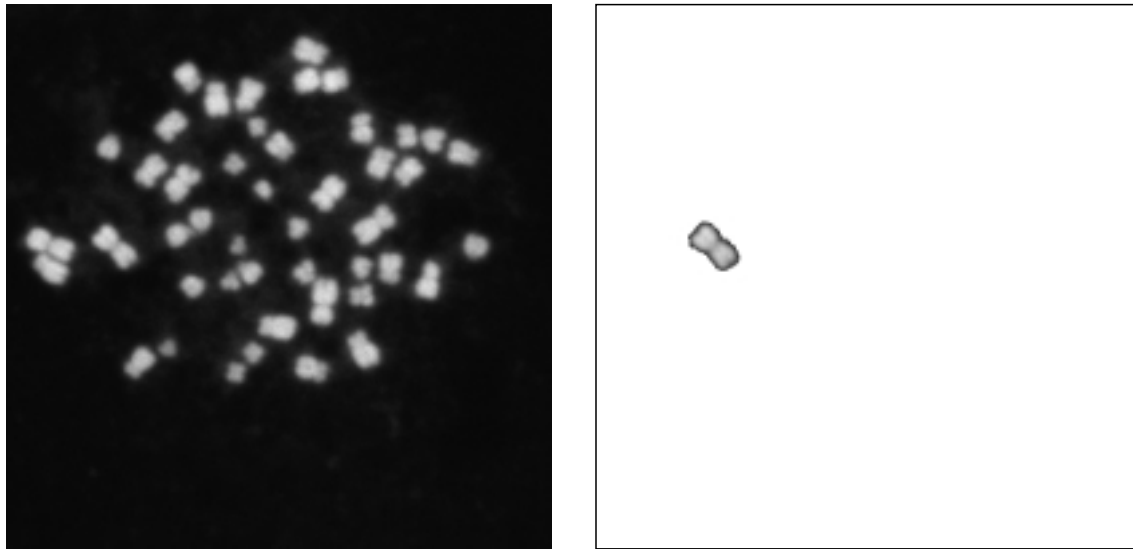


Bild 48: In der links gezeigten Metaphase liegt nur eines der beiden homologen Chromosomen 1 derart frei, daß eine problemlose Segmentierung (rechtes Bild) möglich ist.

Zur Segmentierung ist wieder der Segmentierer mit Hysterese eingesetzt und mit dem ITS-Algorithmus bzw. der Histogrammanalyse parametrisiert worden.

4.6.3 Ergebnisse der DNA-Messungen

Es wurden je 30 Metaphasen in hybridisierten und nicht hybridisierten Präparaten gemessen. Die untenstehende Tabelle zeigt die Resultate der in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchungen an diesen Messungen inklusive der Standardabweichungen sowie den Literaturwert (Passarge 1994) für den relativen (bezogen auf die gesamte Kern-DNA) DNA-Gehalt im weiblichen, humanen Genom.

	relativer DNA-Gehalt	σ
mit FISH:	10.12%	0.8%
ohne FISH:	8.33%	0.6%
Literatur:	8.18%	

Tabelle 6: Der Literaturwert des DNA-Gehaltes von Chromosom 1 kann durch die quantitative Fluoreszenzmikroskopie gut angenähert werden. Die Erhöhung des Gehaltes in Fluoreszenz-Hybriden ist demgegenüber erhöht.

4.7 DNA-Messung in Interphasechromosomen

Im Normalfall kann der DNA-Gehalt fluoreszenzmikroskopisch, wie in (4.6) beschrieben, an gespreiteten Metaphasen gemessen werden. Auf der Basis dieser Information wird die Segmentierung der Interphasechromosomen durchgeführt, so daß sich der korrekte DNA-Gehalt für die Summe beider Chromosomen ergibt. Man kann die segmentierten Domänen der einzelnen Zelle dann auf gleichen DNA-Gehalt überprüfen.

Sobald der genaue DNA-Gehalt nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit durch Metaphaseuntersuchungen vorausgesagt werden kann, z.B. weil Schädigungen in den einzelnen Zellen auftreten, die eine Veränderung des DNA-Gehaltes bewirken, muß dieser individuell, d.h. ggf. auch in Interphasezellen, bestimmt werden. Kernaufgabe hierbei ist die Segmentierung der Domänen, mit der “Masken” für das parallel aufgenommene Bild der DNA-Färbung erstellt werden. Neben histogrammanalytischen Verfahren wie dem ITS-Algorithmus bieten sich mehrstufige Verfahren an, deren Parametrisierung durch Erfahrungen mit ähnlichen und bekannten Szenarien (z.B. Zellen mit intakter DNA) ermittelt wurden. Die Anzahl segmentierter Rauschpixel ist ein Beispiel hierfür (Böcker et al. 1999).

Die folgenden Abschnitte zeigen die Resultate dieser Methoden am Beispiel von 29 gemessenen Zellen, die jeweils zwei intakte Chromosomen 1 bzw. das Signal des DNA-Farbstoffs zeigen.

4.7.1 DNA-Gehalt der homologen Chromosomen

Die Domänen von 29 Zellen wurden so segmentiert, daß ihr DNA-Gehalt den relativen Wert 10.12% annimmt. Die folgende Tabelle zeigt, wie sich die DNA (in %) auf die beiden Chromosomen in den einzelnen Zellen aufteilt. Die Domänen der Zellen 13, 27 und 28 sind durch den verwendeten Segmentierer (RAWS) nicht zu trennen gewesen, so daß sie hier ausgelassen werden.

Zelle	DNA-Gehalt C_1	DNA-Gehalt C_2	Differenz
1	6.73	3.39	3.34
2	3.43	6.69	3.26
3	5.46	4.66	0.8
4	6.14	3.98	2.15
5	5.36	4.76	0.59
6	4.69	5.43	0.74
7	5.02	5.1	0.08
8	5.46	4.66	0.8
9	6.39	3.73	2.67
10	4.8	5.32	0.5
11	4.91	5.21	0.3
12	5.1	5.01	0.09
14	5.32	4.8	0.52
15	6.55	3.57	2.99
16	4.65	5.47	0.82
17	4.36	5.76	1.41
18	5.38	4.74	0.65
19	6.74	3.38	3.37
20	6.3	3.82	2.48
21	6.56	3.56	3.0
22	6.24	3.88	2.36
23	5.73	4.39	1.33
24	5.66	4.46	1.2
25	5.16	4.96	0.19
26	3.55	6.57	3.02
29	4.69	5.43	0.74

Tabelle 7: Der relative DNA-Gehalt der segmentierten Domänen (in % Anteil am Gesamtgehalt) entspricht genau dem Sollwert. Die Tabelle der Werte der einzelnen homologen Chromosomen (C_1 und C_2) zeigt Abweichungen zwischen diesen.

Der Mittelwert der Abweichungen beider Chromosomen im relativen DNA-Gehalt beträgt 1.36 mit $\sigma = 1.17$.

4.7.2 Schwellenwertbestimmung durch den ITS-Algorithmus

Wenn der DNA-Gehalt nicht bekannt ist, bietet sich als vollautomatisches Verfahren der ITS-Algorithmus an, um einen plausiblen Schwellenwert zu definieren. Der Algorithmus findet einen Grauwert, der im Histogramm zwischen den durch Objekt und Hintergrund verursachten Peaks liegt, wobei die Größen dieser Peaks eine Gewichtung für die Verschiebung des Schwellenwertes zur Hintergrundintensität oder zur Objektintensität darstellen.

Ausgewertet werden die beiden größten zusammenhängenden Bildbereiche, die aus Grauwerten bestehen, die größer sind als der durch den ITS-Algorithmus definierte Schwellenwert.

Die folgende Tabelle zeigt für jede der 29 ausgewerteten Zellen den Schwellenwert t_{Approx} , der den genauen DNA-Gehalt (10.12%) näherungsweise reproduziert (der α -Parameter für den RAWs-Algorithmus wurde ausgelassen, da er für den Vergleich eine untergeordnete Rolle spielt und den gemessenen DNA-Gehalt kaum verändert), sowie den durch den ITSA gefundenen Schwellenwert t_{ITSA} und den mit diesem Schwellenwert gefundenen DNA-Gehalt.

Zelle	t_{Approx}	t_{ITSA}	DNA-Gehalt (%)
1	58	52	13.2
2	44	56	8.4
3	43	42	10.74
4	46	51	7.67
5	48	47	10.57
6	58	51	14.88
7	54	56	7.77
8	48	57	7.49
9	54	59	8.35
10	48	57	6.71
11	65	60	12.8
12	57	65	7.3
13	60	54	12.94
14	65	65	10.17
15	65	60	12.8
16	60	61	9.65
17	78	73	11.75
18	80	83	9.9
19	80	79	10.51
20	100	87	13.55
21	85	78	12.46
22	81	76	12.41
23	71	67	11.97
24	74	72	10.68
25	54	50	12.95
26	54	52	11.41
27	42	56	6.31
28	70	63	12.17
29	80	68	14.0

Tabelle 8: Mit dem durch den ITS-Algorithmus bestimmten Schwellenwert t_{ITSA} ergeben sich die hier gezeigten Gehalte an DNA.

Der Korrelationskoeffizient der beiden Schwellenwerte t_{Approx} und t_{ITSA} ist $\rho = 0.65$, die Mittelwerte sind $\bar{t}_{Approx} = 62.8$ und $\bar{t}_{ITSA} = 62$, die Standardabweichungen sind $\sigma_{Approx} = 14.5$ und $\sigma_{ITSA} = 11.08$.

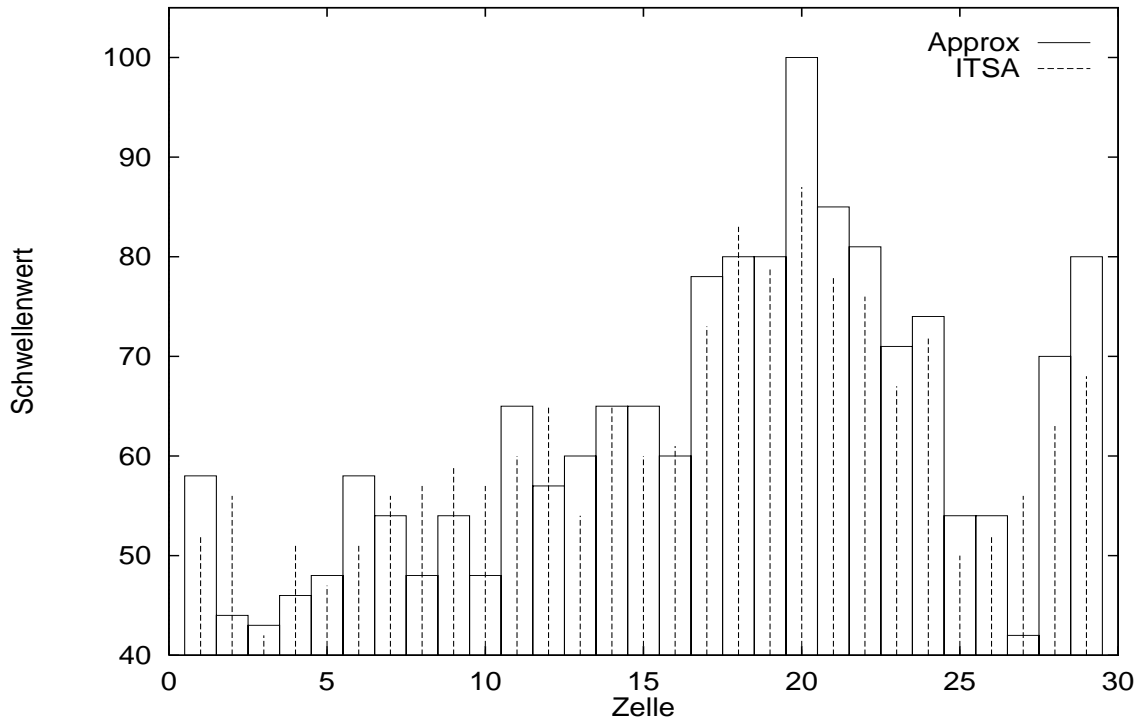


Bild 49: Das Diagramm vermittelt einen Eindruck von der Korrelation zwischen den beiden Schwellenwerten t_{Approx} und t_{ITSA} , die als Balken bzw. Linien gegen die Nummer der Zelle aufgetragen sind.

Der Mittelwert des über den ITS-Algorithmus bestimmten DNA-Gehaltes ist 10.74 mit der verhältnismäßig großen Standardabweichung $\sigma = 2.35$. In Bild 49 ist eine grafische Übersicht der Schwellenwerte gegeben.

4.7.3 Die Anwendung eines mehrstufigen Verfahrens

Böcker et al. (1999) beschreiben ein Verfahren zur automatischen Bestimmung eines Schwellenwertes, das auf der Anzahl der gezählten Segmente (*Number of Objects*, NO) beruht. Wenn der Schwellenwert in den Bereich des Hintergrundes abgesenkt wird, steigt die NO stark an, d.h. man segmentiert Rauschpixel.

Die Information über die NO in Abhängigkeit von einem geeigneten Schwellenwert (der für intakte Zellen aufgrund des bekannten DNA-Gehaltes approximiert werden kann) kann nun auch benutzt werden, um ähnliche Bilder mit unbekanntem DNA-Gehalt zu segmentieren.

Um das Verfahren zu testen, werden 10 aus den bekannten 29 Zellen wahlfrei bezüglich der NO ausgewertet. Für die übrigen 19 Zellen wird dann der Schwellenwert t_{NO} bestimmt, der in etwa die mittlere Anzahl der Rauschpixel aus dem Testsatz reproduzieren kann. Die ausgesuchten Zellen zur Bestimmung der mittleren NO sind in der folgenden Tabelle zu finden.

Zelle	t_{Approx}	NO
1	58	1613
5	48	2783
9	54	1301
11	65	542
13	60	1256
17	78	790
19	80	524
23	71	557
25	54	1250
29	80	652

Tabelle 9: Die mittlere Zahl der “Number of Objects” (NO) wird aus den angegebenen Werten des Testsatzes gebildet.

Der Mittelwert hieraus ist 1126.8. Die übrigen Zellen sollen diesem Wert möglichst nahe kommen. Die folgende Tabelle zeigt den so bestimmten Schwellenwert und den DNA-Gehalt:

Zelle	t_{NO}	NO	DNA-Gehalt (%)
2	61	1135	6.75
3	53	1118	4.85
4	61	1141	4.4
6	70	1148	5.35
7	61	1155	7.64
8	50	1103	9.75
10	52	1135	8.6
12	61	1096	8.62
14	69	1122	9.09
15	67	1121	9.81
16	63	1142	9.01
18	61	1094	16.02
20	69	1174	19.71
21	69	1108	15.6
22	79	1149	11.28
24	72	1121	10.68
26	60	1170	7.77
27	54	1086	6.75
28	63	1163	12.17

Tabelle 10: Die individuelle Bestimmung des DNA-Gehaltes in den beiden Domänen zeigt deutliche Abweichungen vom Sollwert.

Die Werte NO sind angegeben worden, da der mittlere Wert nicht exakt erreicht werden kann. Der Mittelwert des DNA-Gehaltes ist hier 9.68 und $\sigma = 3.86$.

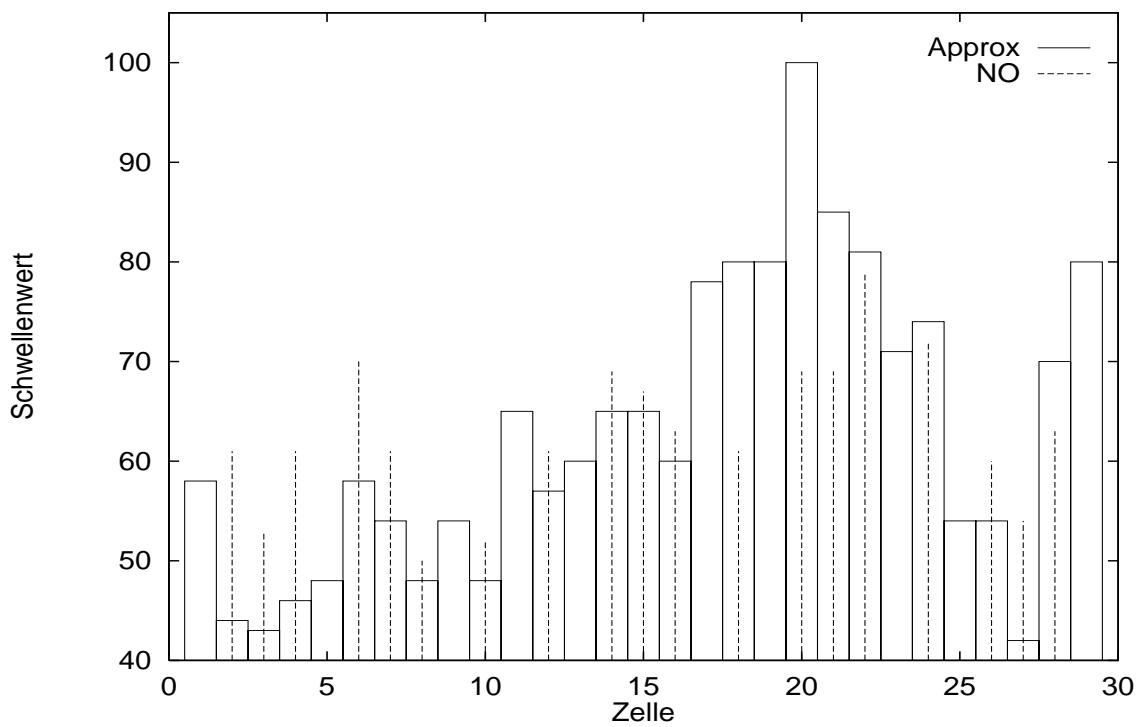


Bild 50: Das Diagramm zeigt die großen Abweichungen des Schwellenwertes, der durch die NO gefunden wurde, vom optimalen Schwellenwert. Es sind nur die Resultate von 19 Zellen berechnet worden, da die übrigen Zellen als Testsatz herangezogen wurden.

Die schlechten Resultate, die Bild 50 visualisiert, sind weniger das Ergebnis der kleinen Statistik mit 10 Werten, als vielmehr das der unterschiedlichen Hybridisierungsqualitäten der Zellen. Die Schwankung der NO bei optimalem Schwellenwert (SB=2259 !) ist hier sehr groß.

4.8 Bestimmung der Volumina von Kern und Domänen

4.8.1 Das Kernvolumen

Das Kernvolumen wird aus der Aufnahme des Propidium Jodid Signals bestimmt. Im Gegensatz zur Messung des DNA-Gehaltes dürfen in diesem Fall die Voxel, die durch die Verbreiterung durch die PSF verursacht werden, nicht berücksichtigt werden, um das Volumen nicht zu überschätzen. Bild 51 zeigt an einem y-Schnitt eines Bildes aus dem Bildstapel den großen Gradienten der Grauwerte am Rand des Kerns. Der ITSA hat hier einen Schwellenwert 52 zur Segmentierung festgelegt, der plausibel erscheint.

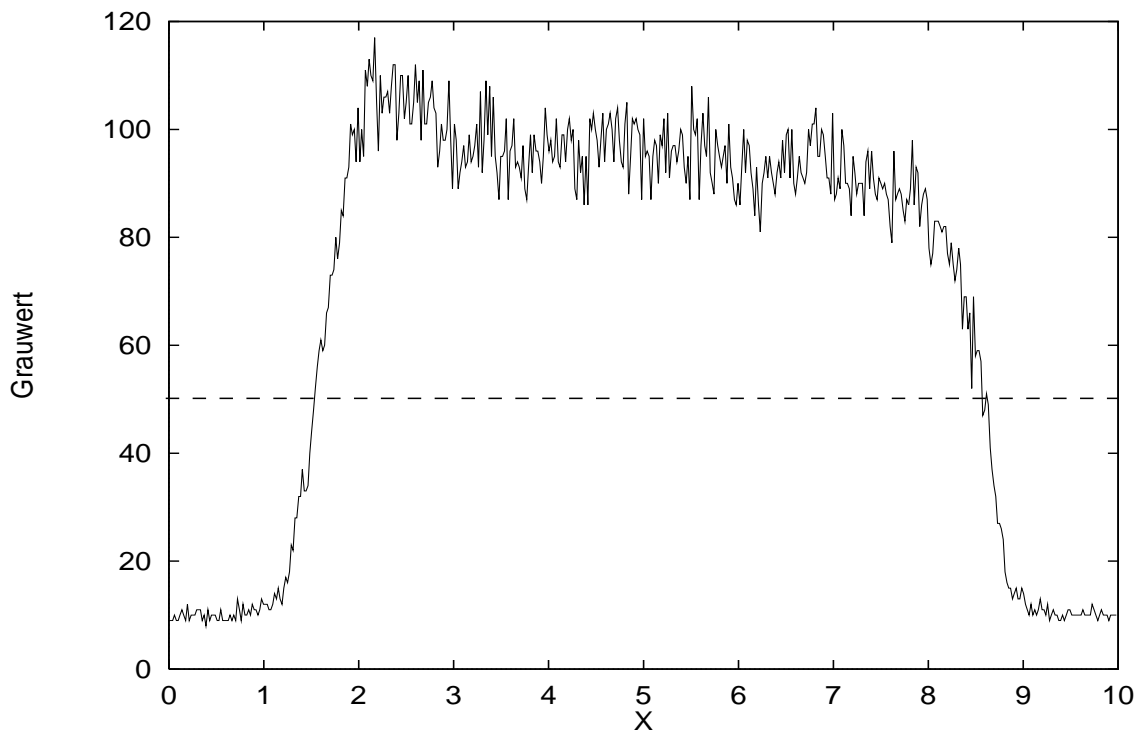


Bild 51: Dieser eindimensionale Schnitt der Grauwerte bei $y=5\mu m$ (also die Mitte des Bildes) zeigt die großen Gradienten am Rand des Kerns. Die gestrichelte Line weist auf den durch den ITS-Algorithmus gefundenen Schwellenwert 52 hin.

Der gefundene Schwellenwert wird nun benutzt, um die zusammenhängenden Bildelemente des Kerns zu segmentieren. Aus den segmentierten Voxeln wird dann das Volumen bestimmt. Die Resultate sind in (4.8.2) zu finden.

4.8.2 Das Volumen der Chromosomendomänen

Die Domänen werden mit dem RAWs-Algorithmus segmentiert, der optimal durch das Vorwissen über den DNA-Gehalt parametrisiert werden kann. Im Gegensatz zum Kern, der eine gleichmäßige Färbung zeigt und sich gut vom Hintergrund absetzt, ist die Färbung der Chromosomen durch die Sonde unregelmäßig. Das hat zur Folge, daß über den Grauwert nicht zwischen unspezifischer Färbung und schwach gefärbten Regionen unterschieden werden kann.

Die Tabelle auf der folgenden Seite zeigt je untersuchter Zelle den Schwellenwert, der zur Kernsegmentierung benutzt wurde, das Kernvolumen, die Volumina der Chromosomen sowie das Verhältnis zwischen Kern- und Chromosomenvolumen. In Klammern angegebene Chromosomenvolumina bedeuten das Gesamtvolumen, d.h. die Chromosomen waren durch die Segmentierung nicht voneinander zu trennen.

Alle Volumina sind in μm^3 angegeben und die Daten für die beiden Chromosomen 1 sind zeilenweise nach ihrer Größe sortiert.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen:

Chromosomenvolumen [μm^3]:	$\bar{x} = 6.92, \sigma = 1.62$
Kernvolumen [μm^3]:	$\bar{x} = 100.39, \sigma = 7.8$
Verhältnis von Kern- zu Chromosomenvolumen:	$\bar{x} = 7.42, \sigma = 0.94$
Differenz zwischen den Chromosomen [μm^3]:	$\bar{x} = 1.24, \sigma = 1.11$

Tabelle 11: Die durch die Bildverarbeitung gemessenen Volumina sind zusammen mit dem Verhältnis von Kern- zu Chromosomenvolumen (beide Domänen) mit den Standardabweichungen angegeben.

Das Verhältnis zwischen Kern- und Chromosomenvolumen scheint aufgrund der geringen gefundenen Standardabweichung eine Erhaltungsgröße der homologen Chromosomen 1 zu sein, der Korrelationskoeffizient zwischen den Volumina ist $\rho = 0.55$. Tatsächlich ist zu beobachten, daß die DNA in unterschiedlich großen Lymphozyten sehr homogen ist, sich das Chromatin also gleichmäßig im Kern verteilt.

Zelle	t_{ITSA}	$V_{Kern} [\mu m^3]$	$C_1 [\mu m^3]$	$C_2 [\mu m^3]$	V/C_{1+2}
1	52	94.64	7.66	4.73	7.64
2	47	108.94	9.37	6.03	7.07
3	50	86.73	5.86	4.58	8.31
4	51	91.11	5.62	3.7	9.78
5	48	103.13	7.78	7.49	6.75
6	64	101.98	7.03	6.42	7.58
7	61	98.94	7.19	6.25	7.36
8	52	100.31	7.13	6.35	7.44
9	57	95.14	8.76	5.51	6.67
10	50	103.37	7.63	6.57	7.28
11	56	109.21	6.29	6.26	8.7
12	57	93.37	6.85	6.54	6.97
13	49	106.7	(11.74)		9.09
14	52	107.43	8.61	8.12	6.24
15	49	108.56	8.24	6.68	7.28
16	58	103.04	7.07	6.66	7.5
17	58	110.98	7.61	6.7	7.76
18	57	104.79	7.02	5.76	8.2
19	66	90.27	7.45	4.46	7.58
20	64	106.23	8.1	6.09	7.49
21	63	102.64	8.08	5.46	7.59
22	61	105.7	9.06	5.65	7.19
23	55	108.88	7.75	7.61	7.09
24	58	99.9	8.35	7.2	6.42
25	58	94.34	6.58	6.0	7.5
26	53	81.19	6.39	4.63	7.37
27	79	109.62	(25.9)		4.23
28	54	96.86	(12.28)		7.89
29	53	87.33	6.24	6.24	7.0

Tabelle 12: Neben den Volumina von Domänen und Kern ist auch das Verhältnis der beiden angegeben.

4.9 Oberfläche der Chromosomendomänen

Zur Oberflächenbestimmung wurden die Operatoren “Closing” und “Opening” aus der Mathematischen Morphologie sukzessive auf die segmentierten Domänen angewandt, um “glatte” Oberflächen zu erhalten. Bild 52 zeigt die geglättete Oberfläche an den (binären) Schnittbildern einer Domäne.

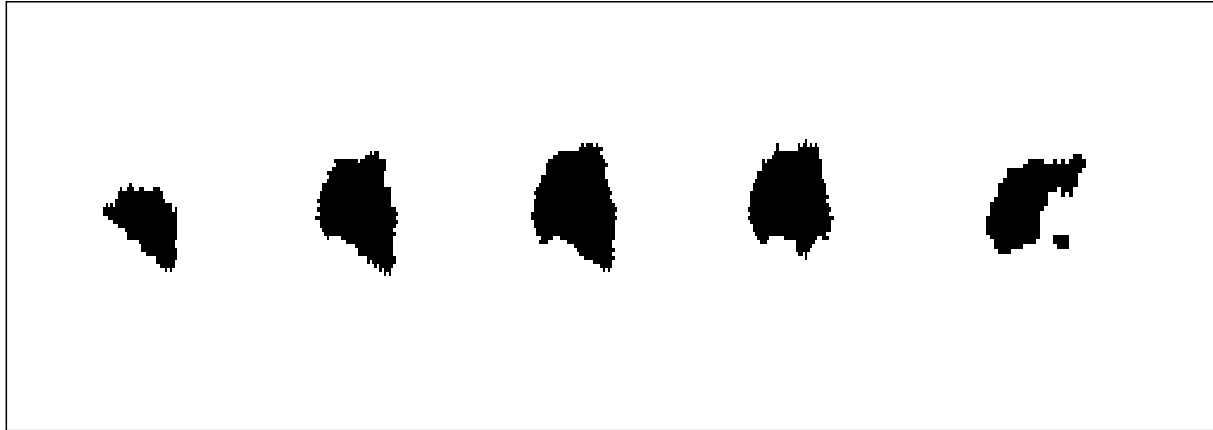


Bild 52: Auf Skalen unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops erscheint die Oberfläche dieser Domäne, von der hier die binären Schnittbilder gezeigt sind, glatt. Es wurde sukzessive ein Closing und ein Opening Operator mit einem runden Strukturelement (Radius $100nm$) auf das Segment angewandt. Da diese Dimensionierung die axiale Auflösung unterschreitet, konnte auf eine dreidimensionale Verarbeitung durch die Operatoren der Mathematische Morphologie verzichtet werden.

Aufgrund der Verschmierung durch die PSF sind Strukturen unterhalb ihrer Halbwertsbreite (HWB) ohnehin nicht zu erwarten. Als Strukturelement diente eine Kugel mit einem Radius von $100nm$. Die so bearbeiteten Bilder wurden durch den Marching Cubes-Algorithmus weiterverarbeitet, so daß eine Pakettierung der Oberfläche mit Dreiecken erfolgte. Die Summe der Flächeninhalte wurde dann als Schätzwert der Oberfläche verwendet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. Zusätzlich werden Differenz und Summe der Oberflächen angegeben:

Zelle	A_1	A_2	ΔA	$A_1 + A_2$
1	916.64	705.54	211.10	1622.18
2	814.35	1082.53	268.18	1896.88
3	831.97	752.61	79.35	1584.58
4	733.83	732.43	1.40	1466.26
5	1013.02	968.17	44.85	1981.19
6	950.01	867.84	82.17	1817.85
7	723.46	776.08	52.62	1499.54
8	775.84	700.01	75.82	1475.85
9	799.72	777.79	21.92	1577.51
10	848.60	795.96	52.64	1644.56
11	767.77	696.10	71.67	1463.87
12	828.48	737.38	91.10	1565.86
14	763.84	867.34	103.50	1631.18
15	858.99	800.50	58.49	1659.49
16	777.83	801.65	23.82	1579.48
17	719.27	797.50	78.23	1516.78
18	700.56	590.39	110.17	1290.95
19	752.29	588.78	163.52	1341.07
20	775.78	662.55	113.23	1438.33
21	793.22	643.70	149.53	1436.92
22	850.05	757.64	92.40	1607.69
23	824.21	797.37	26.84	1621.58
24	1003.35	842.52	160.83	1845.87
25	804.73	824.95	20.22	1629.68
26	625.44	941.57	316.13	1567.02
29	725.21	677.17	48.04	1402.37

Tabelle 13: Für jede Zelle, in der sich die Domänen getrennt segmentieren ließen, ist neben deren Oberfläche auch die absolute Differenz sowie die Gesamtoberfläche in μm^2 angegeben.

$\overline{A} = 791.63$	$\sigma = 100.88$
$\overline{ A_1 - A_2 } = 96.84$	$\sigma = 74.83$
$\overline{A_1 + A_2} = 1583.25$	$\sigma = 160.42$

Tabelle 14: Die Mittelwerte aus den Oberflächenberechnungen (Alle Angaben in μm^2) zeigen starke Schwankungen.

4.10 Position und Lage der Domänen

Die Position und Lage der Chromosomendomänen wurden mit dem ersten bzw. zweiten zentralen Moment der Grauwertverteilung bestimmt. In Bild 54 erkennt man die Anordnung der Domänenschwerpunkte in der Auf- bzw. Seitenansicht. Die Schwerpunkte wurden in diesem Diagramm so verschoben, daß das erste der beiden homologen Chromosomen 1 eines Kerns die Koordinaten (0,0,0) bekam. Der mittlere Abstand zwischen zwei Domänen ist nach dieser Definition $4.09\mu m$ mit $\sigma = 680nm$.

Das Diagramm in Bild 53 zeigt die Winkel zwischen den beiden Vektoren, die aus der Differenz der beiden Momente der Chromosomen gewonnen wurden. Diese Vektoren zeigen im wesentlichen in die Richtung der größten Ausdehnung der Domänen, so daß man aus ihnen die Lage definieren kann.

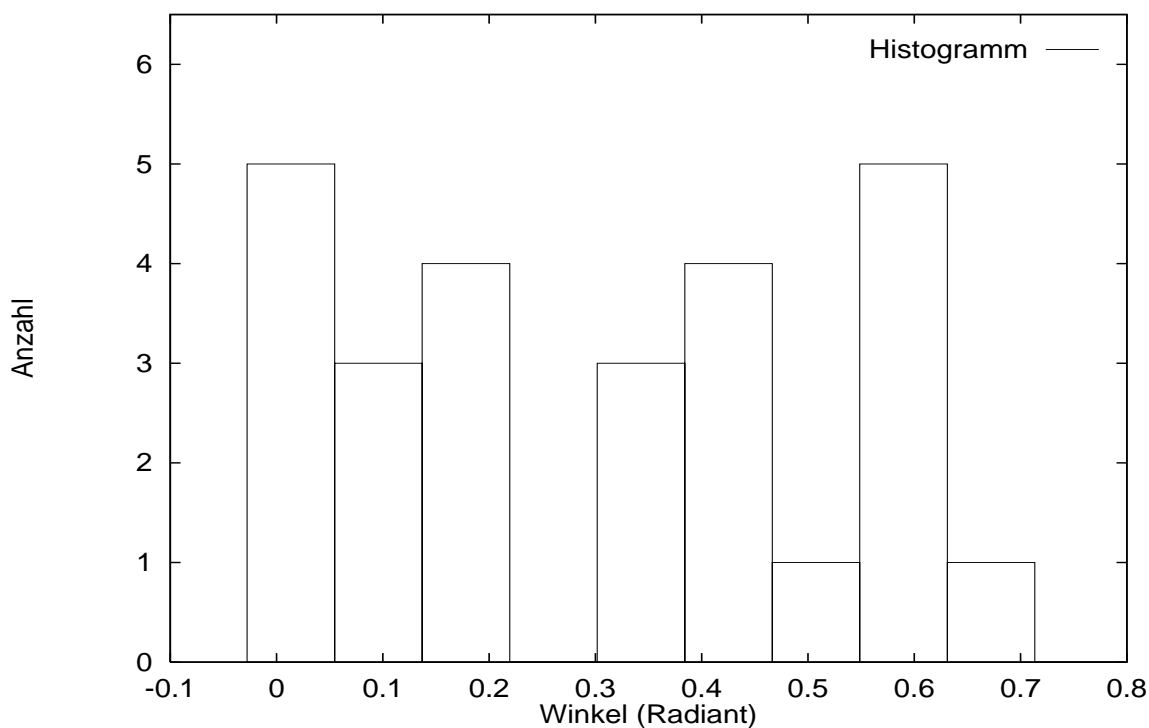
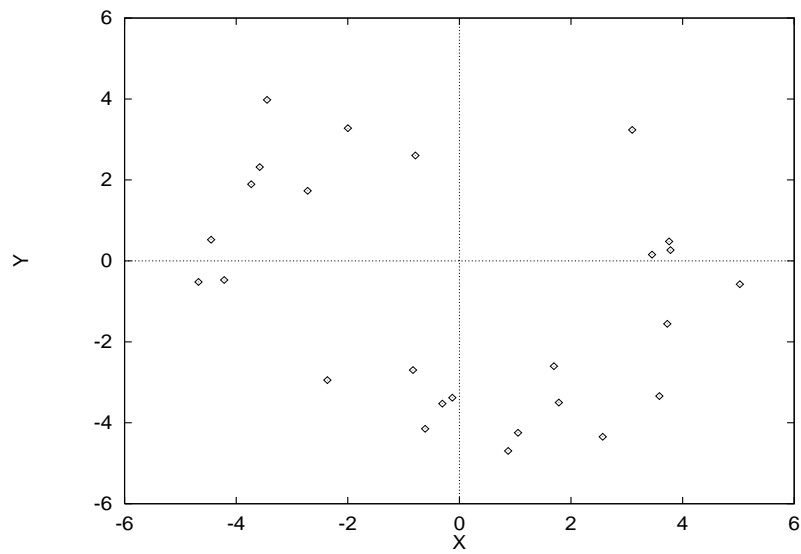
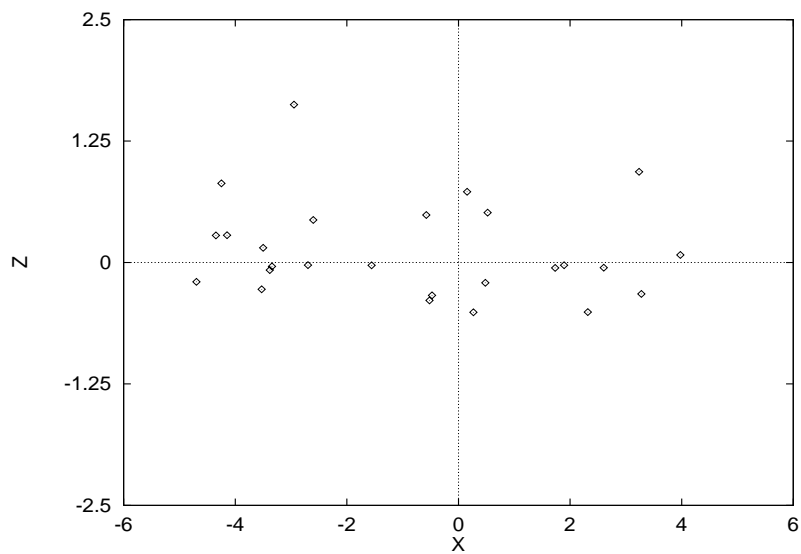


Bild 53: Die Winkel zwischen den Lagevektoren der homologen Chromosomenpaare in den einzelnen Zellen sind bis etwa 45° (0.8 Radiant) gleichverteilt.



Position der Domänen in der Draufsicht



Position der Domänen in der Seitenansicht

Bild 54: Weder im Abstand in der X-Y Ebene, noch in der Höhe unterscheiden sich die Domänenpaare wesentlich. Die Koordinaten sind in μm .

4.11 Dreidimensionale Visualisierung

Die folgenden Bilder zeigen die homologen Chromosomenpaare 1 aller gemessenen Lymphozytenkerne. Um einen räumlichen Eindruck zu gewinnen, muß das jeweils linke Bild mit dem linken Auge und das jeweils rechte Bild mit dem rechten Auge betrachtet werden, d.h. es muß ein Punkt *hinter* dem Bild fixiert werden. Mit etwas Übung gelingt in der Regel ein entspanntes Betrachten der Aufnahmen.

Die Domänen liegen nebeneinander so im Zellkern, wie im Bild 19 exemplarisch gezeigt ist.

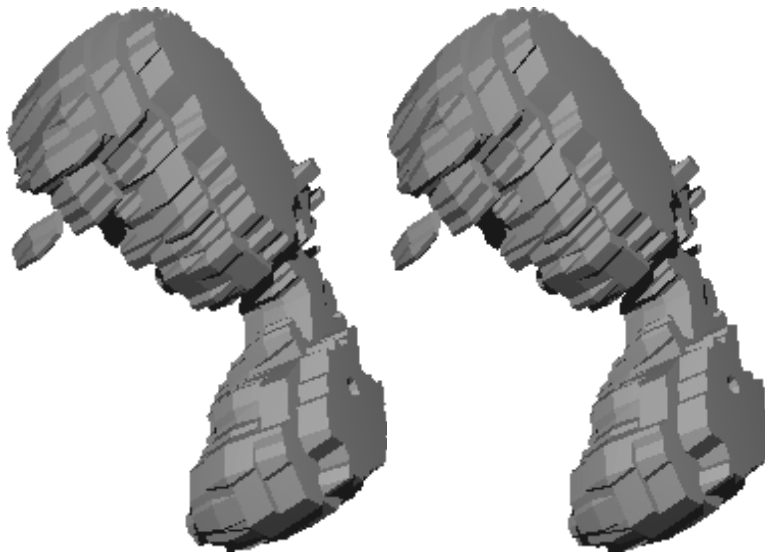


Bild 55: Die Chromosomen 1 der Zelle “1”.

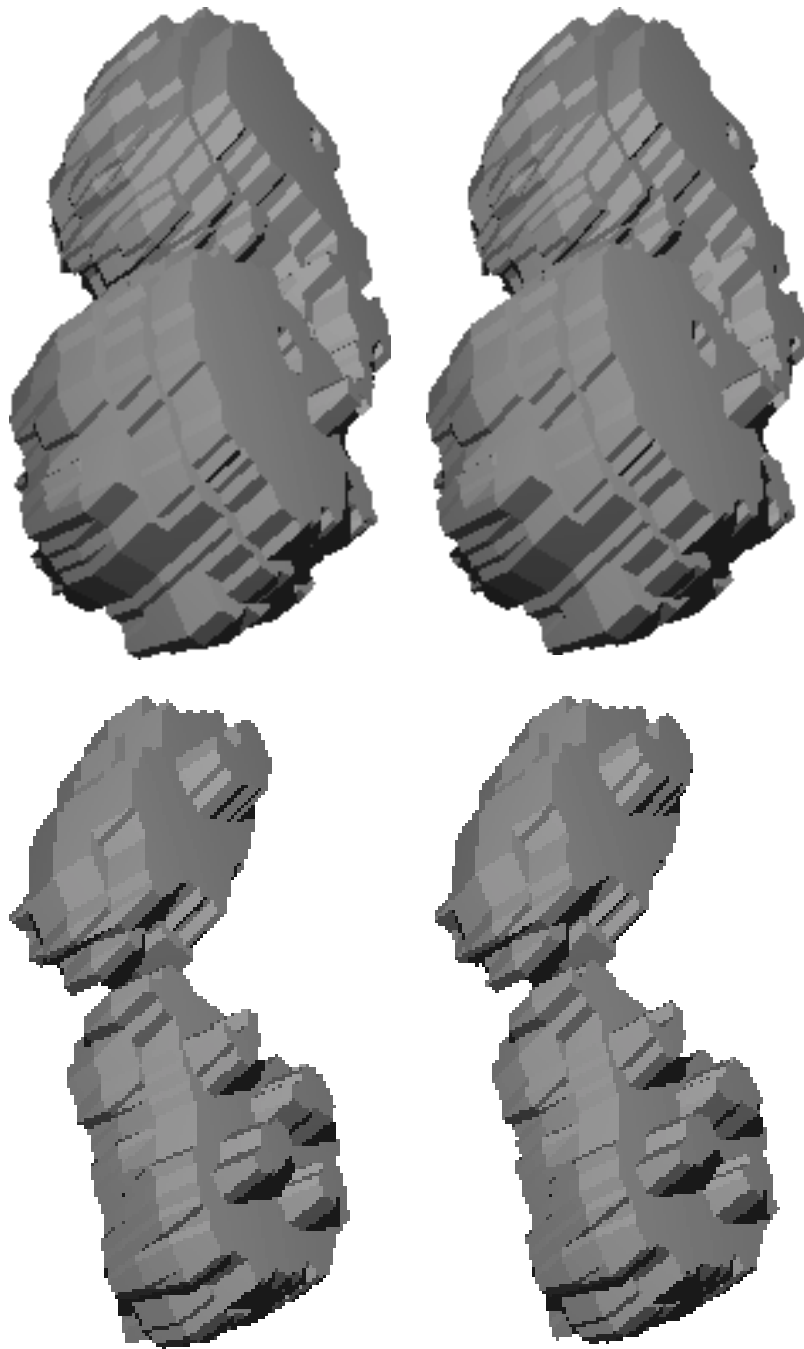


Bild 56: Die Chromosomen 1 der Zellen “2” (oben) und “3” (unten).

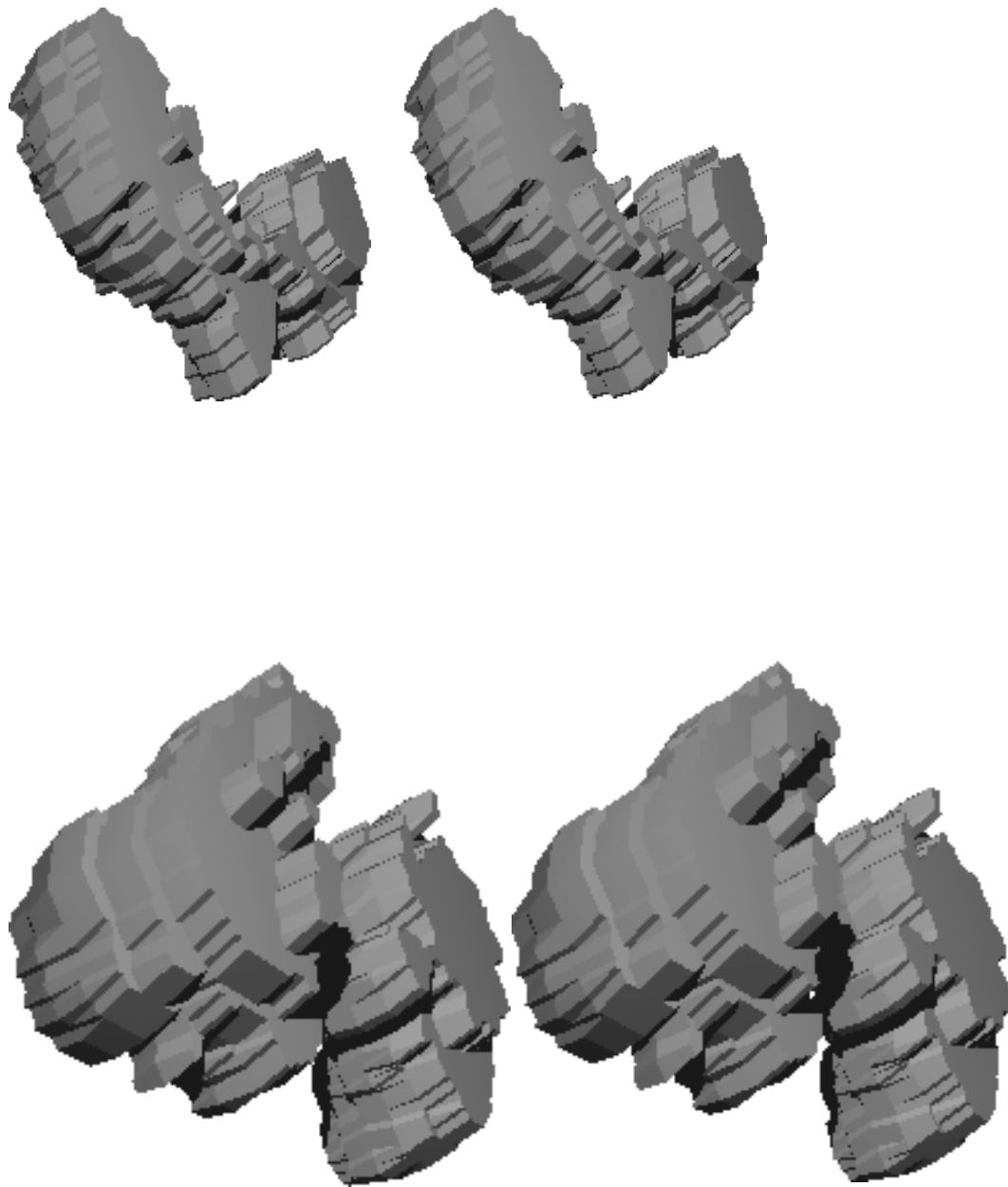


Bild 57: Die Chromosomen 1 der Zellen “4” (oben) und “5” (unten).

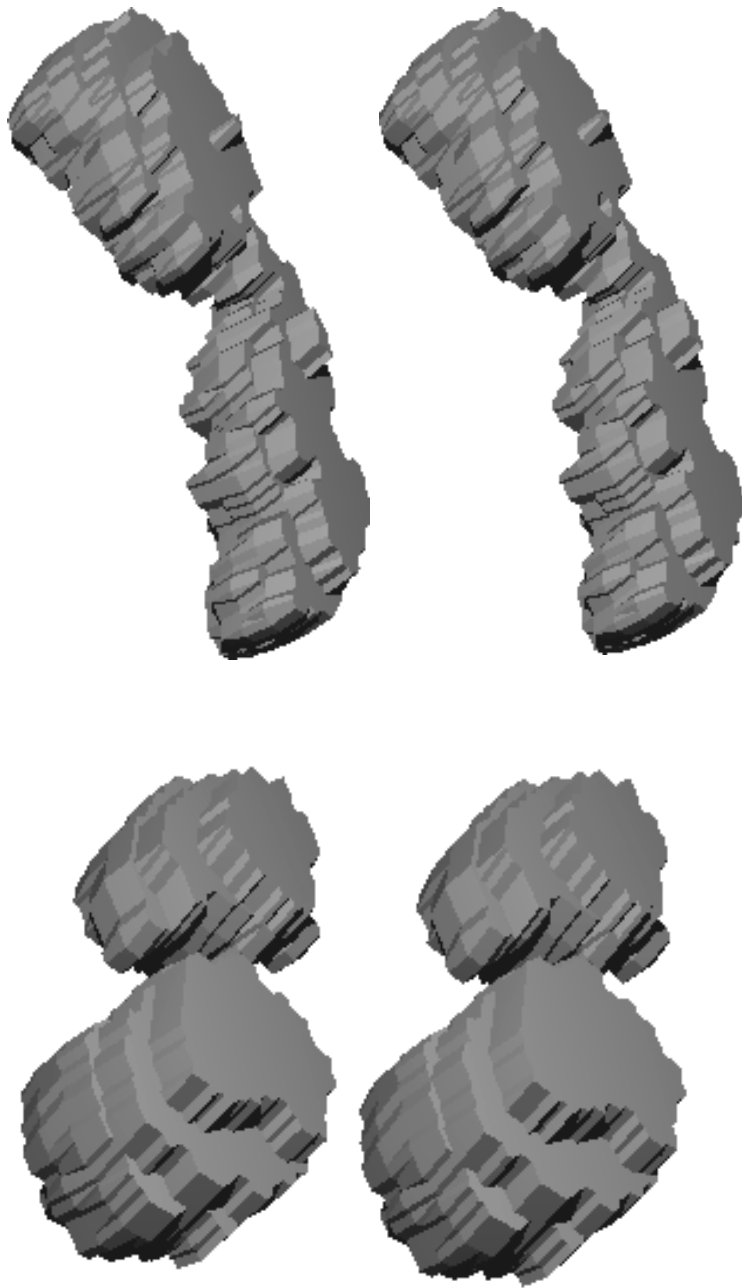


Bild 58: Die Chromosomen 1 der Zellen “6” (oben) und “7” (unten).

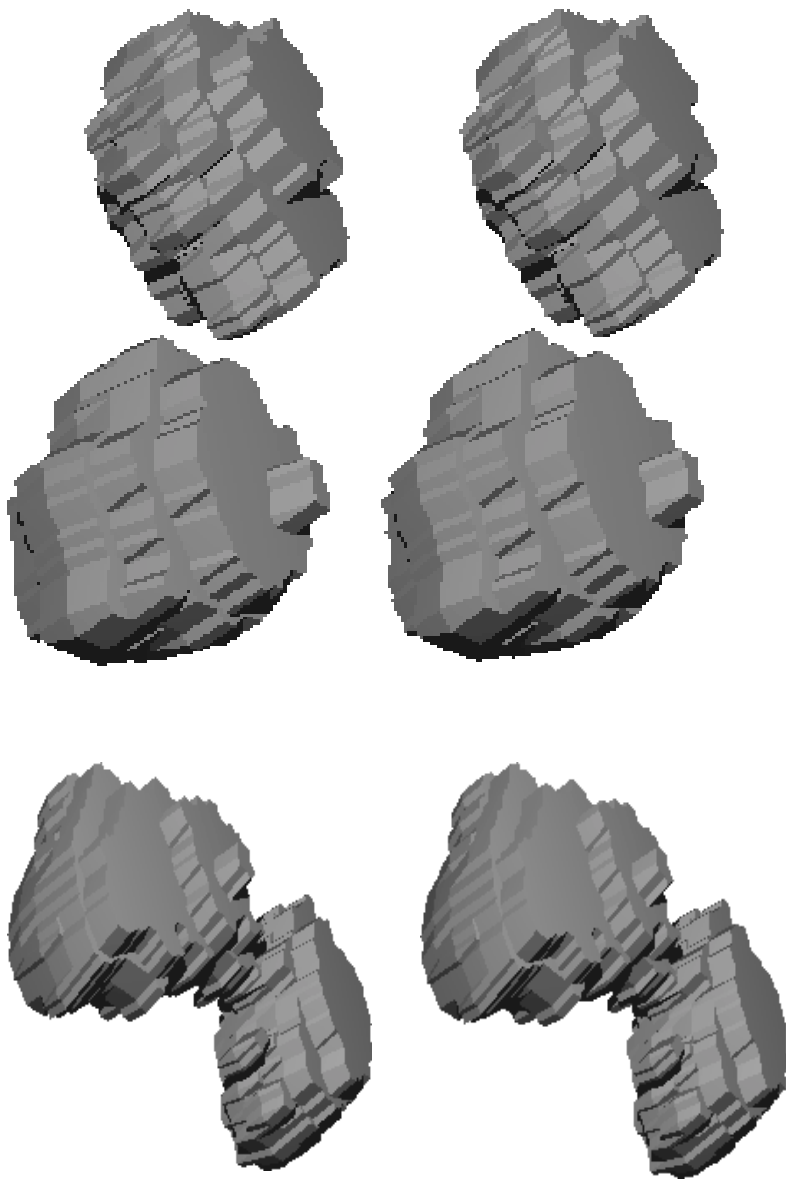


Bild 59: Die Chromosomen 1 der Zellen “8” (oben) und “9” (unten).

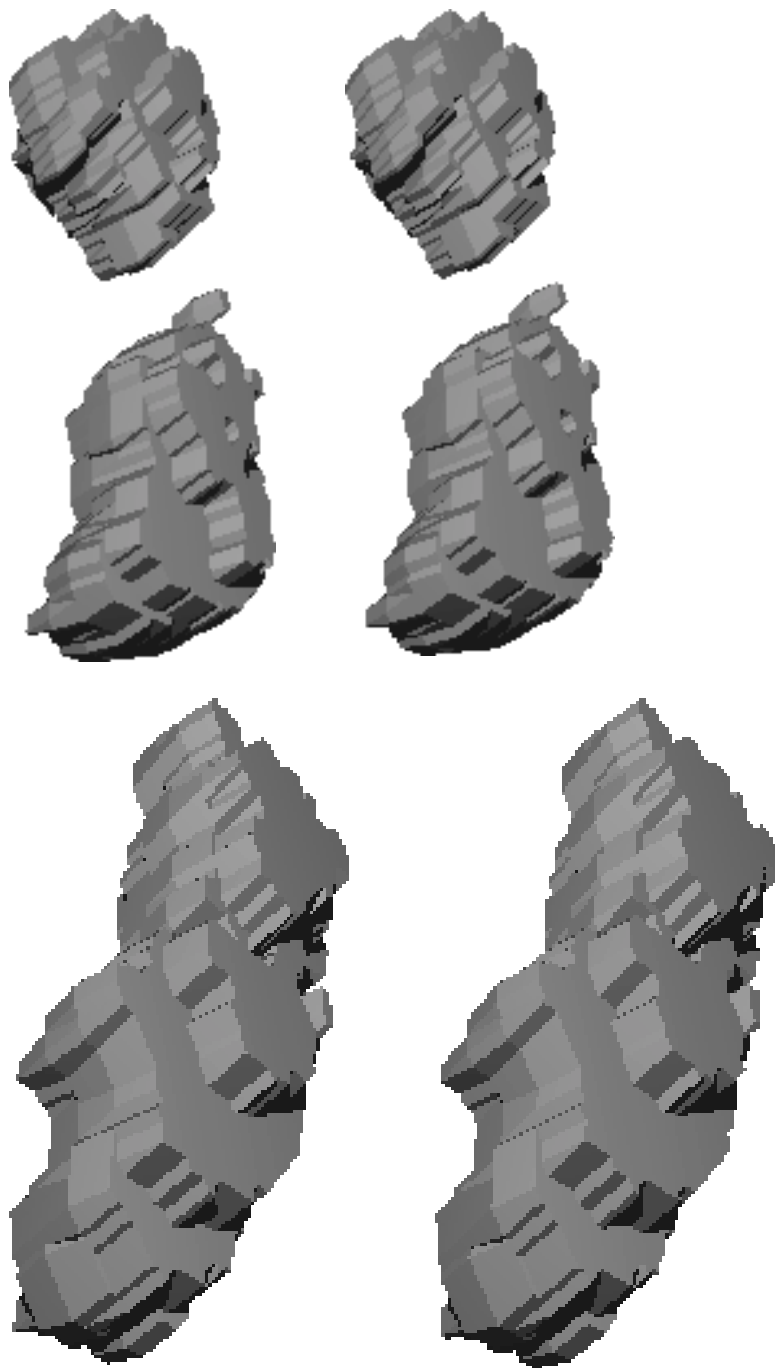


Bild 60: Die Chromosomen 1 der Zellen “10” (oben) und “11” (unten).

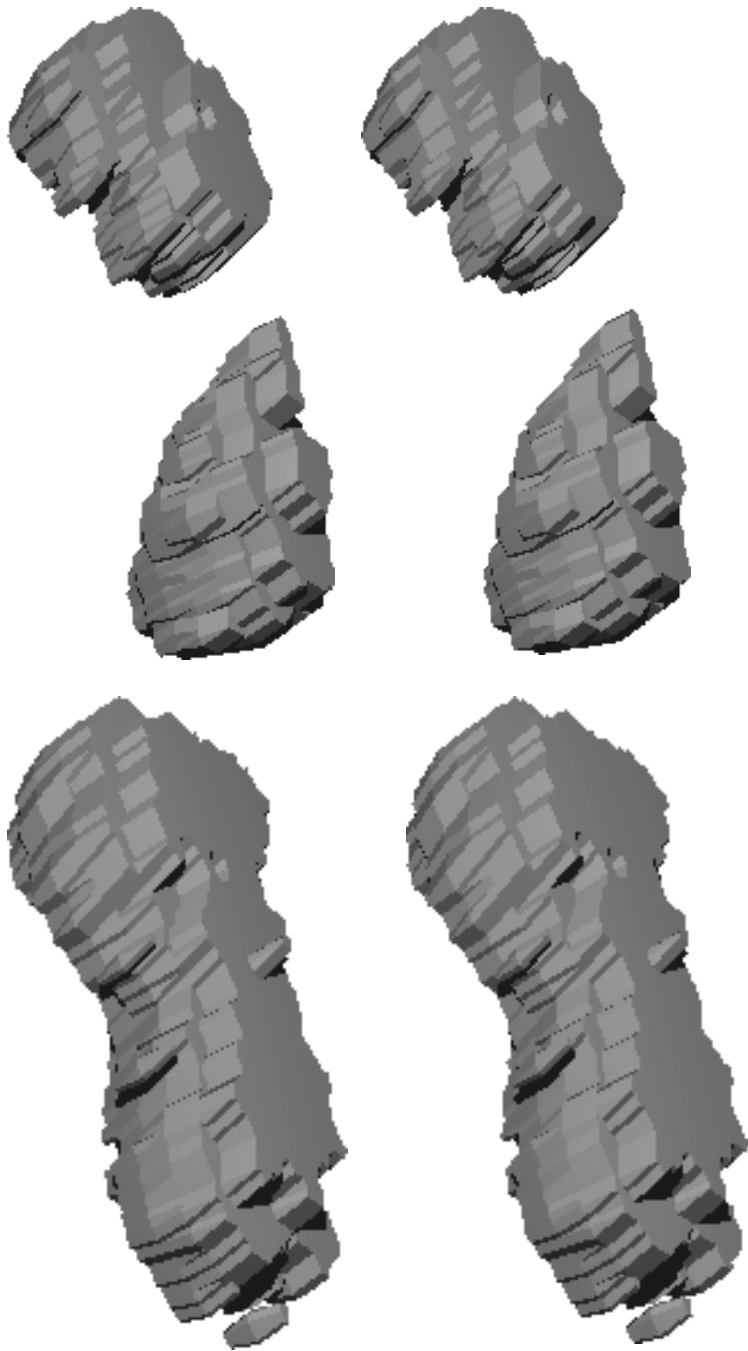


Bild 61: Die Chromosomen 1 der Zellen “12” (oben) und “13” (unten).

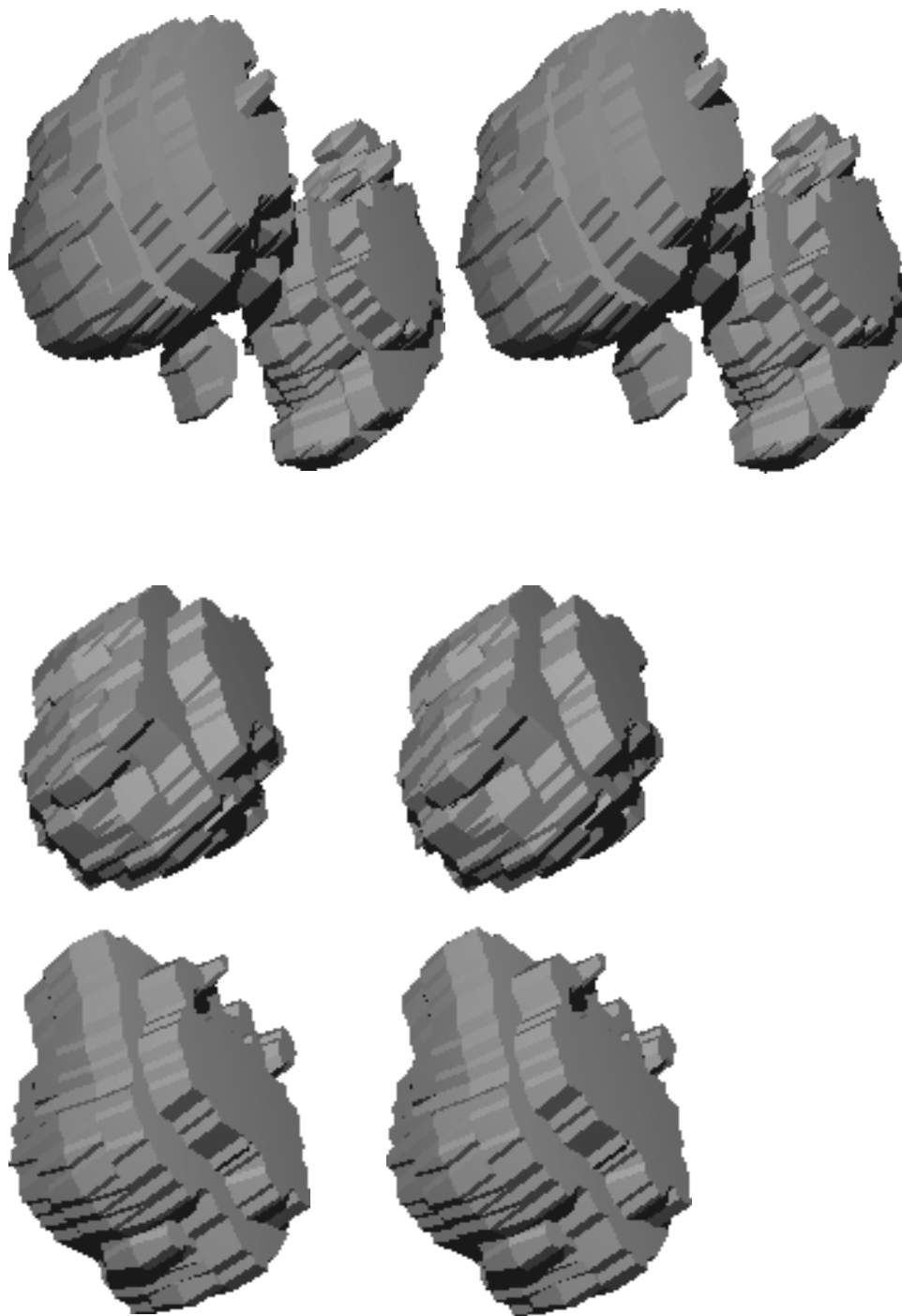


Bild 62: Die Chromosomen 1 der Zellen “14” (oben) und “15” (unten).

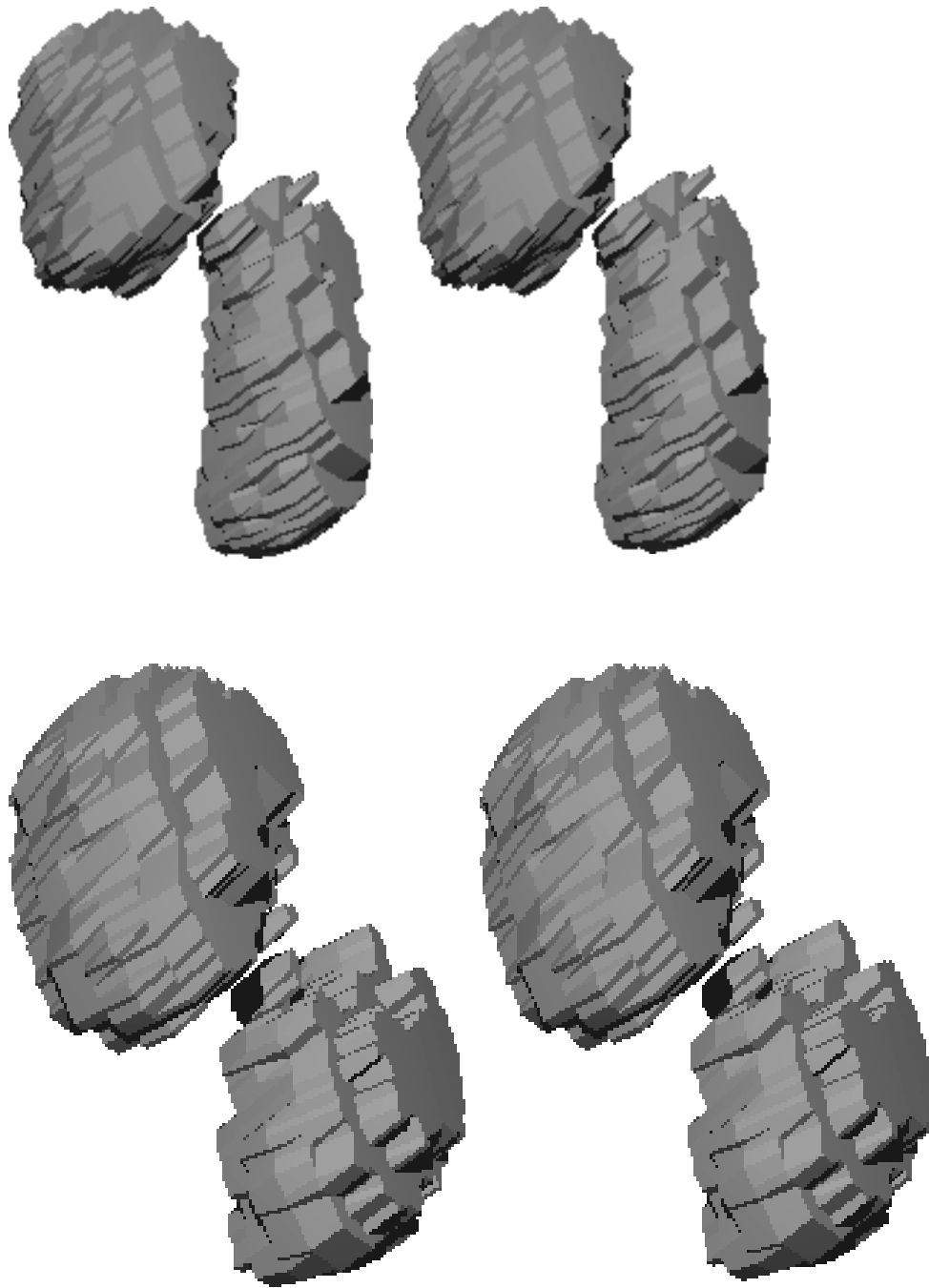


Bild 63: Die Chromosomen 1 der Zellen “16” (oben) und “17” (unten).

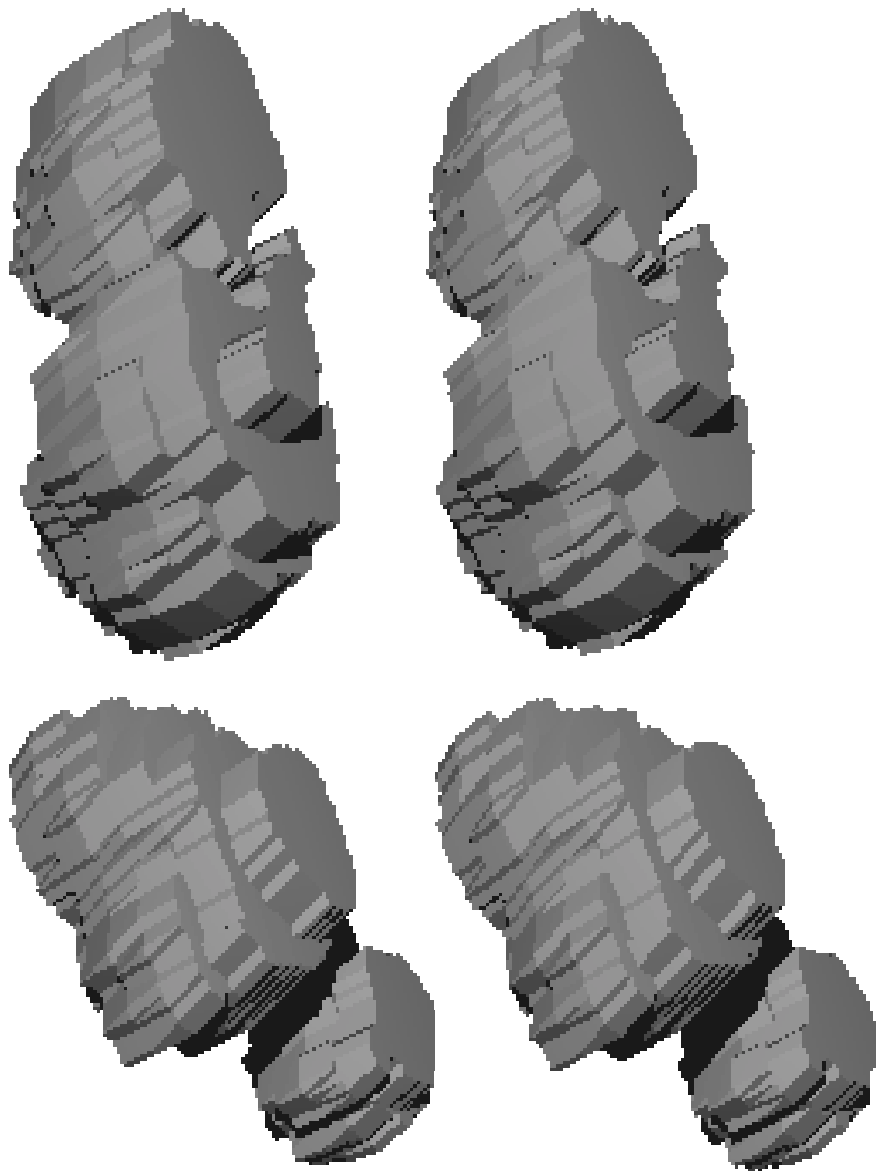


Bild 64: Die Chromosomen 1 der Zellen “18” (oben) und “19” (unten).

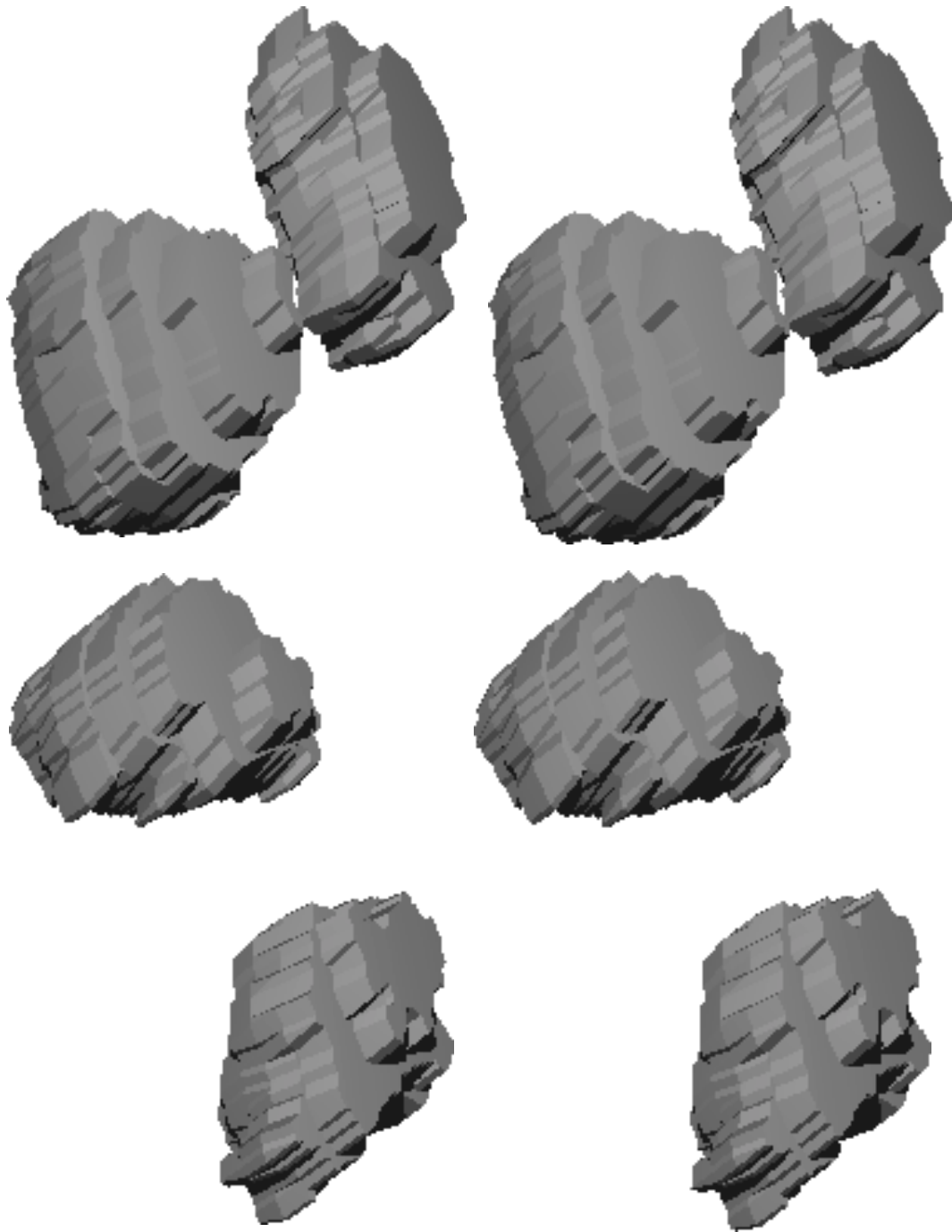


Bild 65: Die Chromosomen 1 der Zellen “20” (oben) und “21” (unten).



Bild 66: Die Chromosomen 1 der Zellen “22” (oben) und “23” (unten).

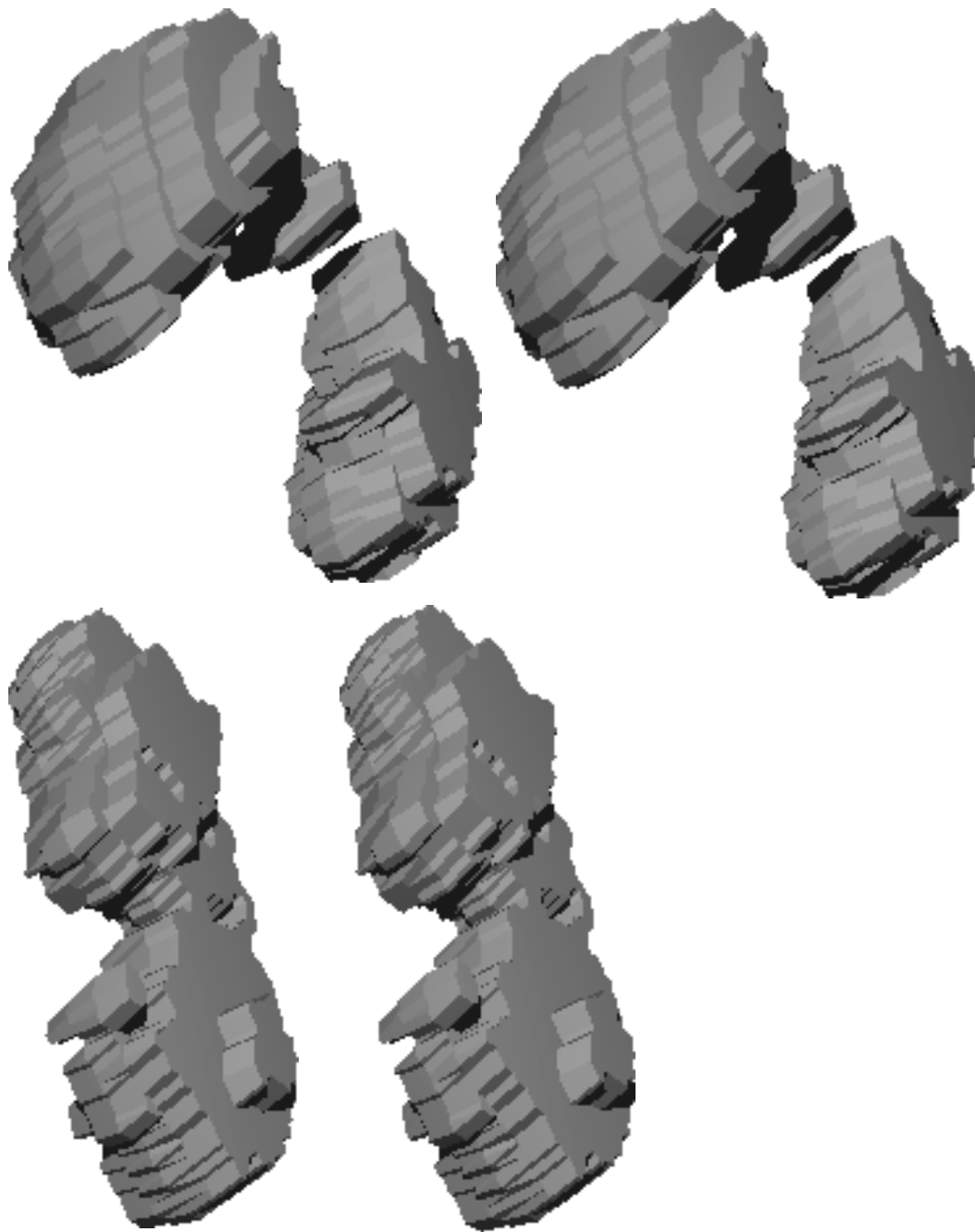


Bild 67: Die Chromosomen 1 der Zellen “24” (oben) und “25” (unten).

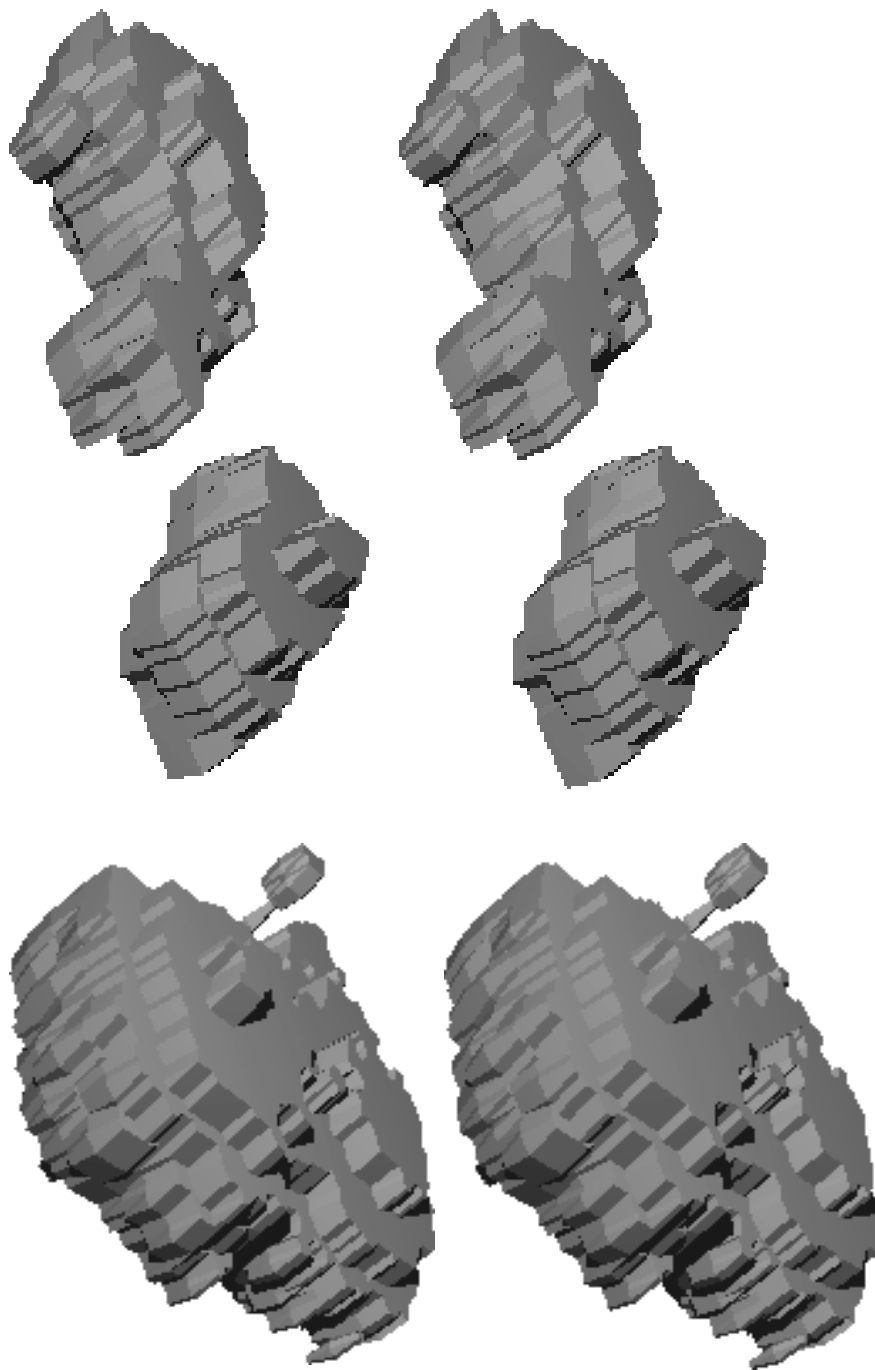


Bild 68: Die Chromosomen 1 der Zellen “26” (oben) und “27” (unten).

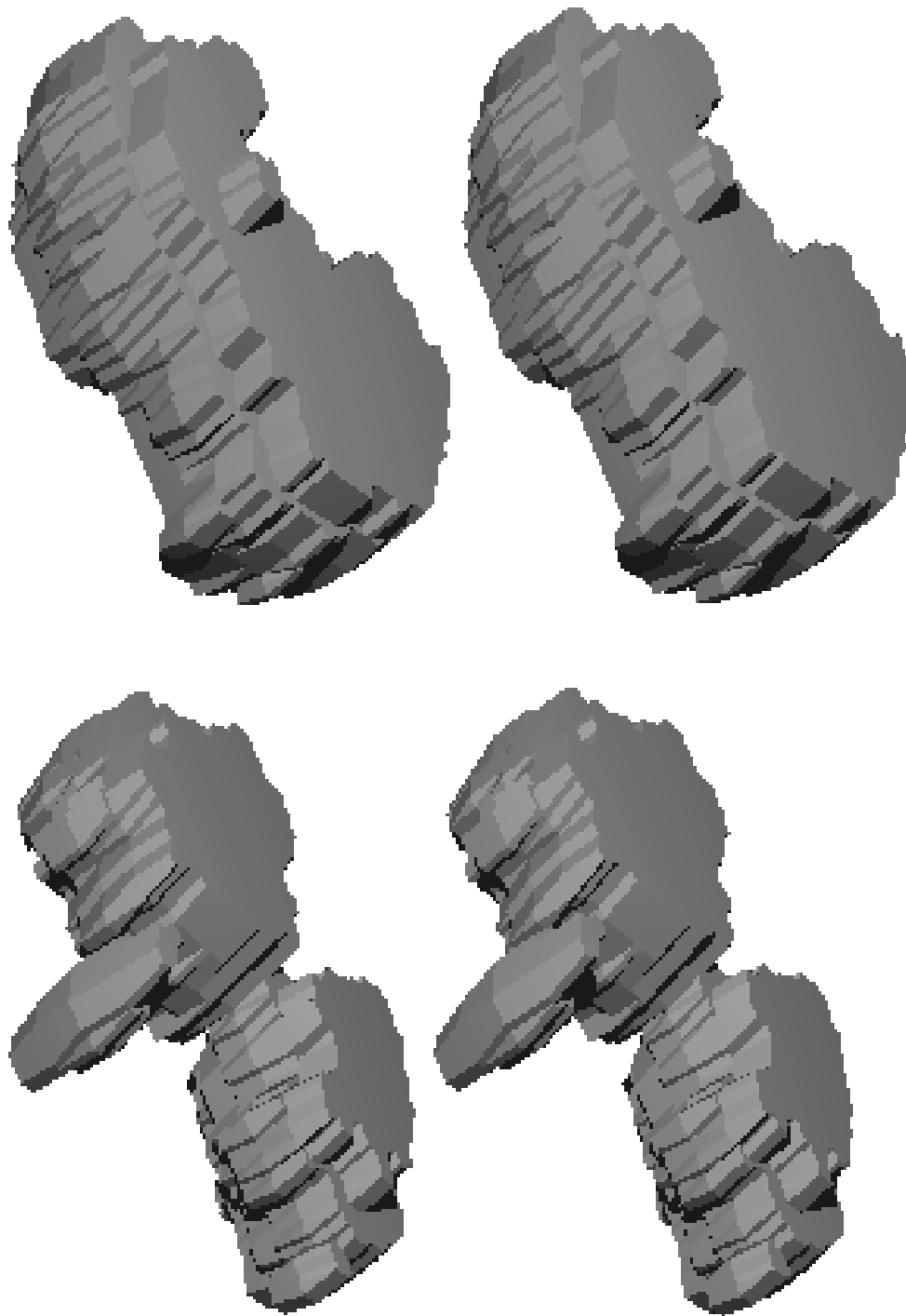


Bild 69: Die Chromosomen 1 der Zellen “28” (oben) und “29” (unten).

5

Diskussion

Qualitative Fehlerbetrachtung: Die Hybridisierung der Chromosomen mit der Sonde, die Bildaufzeichnung der Präparate durch das Laserscanning-Mikroskop und die für die Quantifizierung von Oberfläche und Volumen notwendige Bildverarbeitung beinhaltet eine Vielzahl an Fehlerquellen, die sich überwiegend schlecht abschätzen lassen.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist ein invasives Verfahren zur Färbung der Chromosomen, wie die Anhebung des *gemessenen* DNA-Gehaltes auf 10.12% zeigt (Abschnitt 4.6). Zudem handelt es sich nicht um eine stöchiometrische Methode zur Markierung, so daß ggf. Teilbereiche des Chromosoms ungefärbt und damit in der Auswertung unberücksichtigt bleiben können.

Die Färbung der DNA, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Jodid erfolgt, ist unter natürlichen Bedingungen weitgehend stöchiometrisch, jedoch muß mit einem Einfluß der Sonde hierauf gerechnet werden. Die Erhöhung des DNA-Gehaltes ist zu unbekannten Teilen auf die gestörte Stöchiometrie in den hybridisierten Bereichen des Chromosoms, sowie auf das Einbringen zusätzlicher DNA durch die Sonde zurückzuführen.

Variierende, unbekannte optische Dichten in den Zellen führen zur Streuung sowohl des Anregungs- als auch des Fluoreszenzlichtes. Dieser Effekt ist im Kontext dieser Arbeit vernachlässigbar (Abschnitt 4.5).

Das konfokale Mikroskop erzeugt verschiedene Abbildungsfehler, die in den einzelnen Untersuchungen unterschiedlich zum Tragen kommen. Die wesentlichen Fehlerquellen liegen in der Herabsetzung der Ortsauflösung durch die Punktverwaschungsfunktion und dem nicht-additiven Rauschen des Detektors. Beide Fehlerquellen haben einen Einfluß auf die Oberflächenbestimmung (Abschnitt 4.9). Zudem ist die Übertragung der Intensität im unteren Dynamikbereich nichtlinear, wenngleich dieser Effekt gering ist und vernachlässigt wird, da die gemessenen Strukturen im linearen Bereich liegen. Das gemessene Signal wird zusätzlich durch einen Analog/Digital-Wandler in 256 Werte diskretisiert.

Die Messwerte durchlaufen verschiedene Vorverarbeitungsschritte, bevor sie der Auswertung zugeführt werden können: Notwendig ist die Korrektur des Fadings, wobei diese gleichzeitig eine Anhebung des Rauschsignals bewirkt. Überdies variiert der Exponent der Zerfallskurve der Fluorochrome mit der Dosisleistung des Anregungslichtes (Nagelhus 1996). Für einige Untersuchungen sind Rauschfilter notwendig, die im wesentlichen eine weitere Herabsetzung der Ortsauflösung bewirken.

Die Segmentierung der Chromosomen basiert auf der Annahme, daß es ein oder zwei zusammenhängende Gebiete gibt, die, mit einem geeigneten Schwellenwert segmentiert, den relativen Gehalt an DNA der Chromosomen 1 enthalten. Man darf jedoch nicht außer acht lassen, daß es durch unspezifische und durch mangelnde Markierungen der Chromosomen zu Fehlinterpretationen der Bilder bezüglich der genauen Ausdehnung und Lage der Domänen kommen kann.

Die Oberflächenberechnung, so wie sie in dieser Arbeit realisiert worden ist, setzt den Einsatz von Operatoren aus der Mathematischen Morphologie voraus, um die äußere Struktur der Chromosomen zu glätten. Es muß beachtet werden, daß dieses Vorgehen (zusammen mit den übrigen Schritten der Bildverarbeitung) die Oberfläche definiert. Gefordert werden sollte hierbei ein linearer Zusammenhang zu den verschiedenen anderen Oberflächendefinitionen. Über die zwangsläufigen Abweichungen hiervon kann hier keine Aussage getroffen werden.

Vermessung des Mikroskops: In quantitativen Messungen sind Intensitätsstandard-Objekte erforderlich. Die erhältlichen Produkte lassen eine Analyse der Übertragungseigenschaften des Systems im gesamten Dynamikbereich des gemessenen Fluoreszenzlichtes bei einer relevanten Einstellung des Mikroskops zu. Es hat sich gezeigt, daß das Leica TCS 4D eine nahezu lineare Kennlinie im verwendeten Dynamikbereich aufweist.

Die Bestimmung der *Point Spread Function* (PSF) hat ergeben, daß das LSM selbst bei einer relativ weit ($\approx 200\text{ nm}$) geöffneten Detektions-Lochblende eine Punktübertragungsfunktion besitzt, die mit der für unendlich kleine Lochblenden zu erwartenden, theoretischen PSF in ihrer lateralen Breite sehr gut übereinstimmt. Die axiale Breite ist demgegenüber um ein Drittel größer als vorausgesagt.

Chromatische Abberationen (aufgrund unterschiedlicher Brechungswinkel sowie den Versatz durch Interferenzfilter) sind im Leica TCS 4D ausreichend korrigiert.

Die Standardabweichung des Rauschens (RMS) zeigt eine Abhängigkeit vom mittleren gemessenen Grauwert. Das Rauschen ist also nicht-additiv.

Bezüglich des Fluorochroms "FITC" ist eine Korrektur der gemessenen Grauwerte erforderlich, da hier ein signifikantes Fading zu verzeichnen ist.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in Hybriden: Es hat sich gezeigt, daß die Fluoreszenz in situ Hybridisierung zu einer Anhebung des gemessenen, relativen DNA-Gehaltes in den entsprechend präparierten Chromosomen führt. Die Bestimmung ist aus zwei Gründen an Metaphase-Chromosomen durchgeführt worden: Zum einen wird insbesondere die Meßgenauigkeit bei Analyse von distinkt liegenden Chromosomen erhöht, da der Segmentierer in keinem Falle unspezifische Signale angrenzender Chromosomen berücksichtigt. Zum anderen ist in der Metaphase auch die Quantifizierung der nicht-hybridisierten Chromosomen möglich. Im Falle des humanen Chromosoms 1 ist eine Unterscheidung von den übrigen Chromosomen unproblematisch. Die eingesetzten Werkzeuge zur Segmentierung und Quantifizierung lieferten plausible Ergebnisse, wie man aus der guten Übereinstimmung des hier gemessenen, relativen DNA-Gehaltes der Chromosomen 1 mit dem Literaturwert (Passarge 1994) ersehen kann.

Das Wissen über den DNA-Gehalt kann zur Untersuchung von intakten Chromosomen in der Interphase verwendet werden. Wenn der adaptive *Random Walk Segmentation*-Algorithmus (RAWS) eingesetzt wird, kann dieses Vorwissen zur Parametrisierung herangezogen werden.

Ohne Wissen über den korrekten DNA-Gehalt, z.B. in geschädigten Zellen, kann das automatische ITSA-Verfahren gute Resultate liefern.

Aufgrund der schwankenden Hybridisierungsqualität der einzelnen Zellen, welche eine Inkonstanz der Anzahl von Objekten im Hintergrund bewirkt, stellt die Auswertung der NO (*Number of Objects*) keine brauchbare Alternative dar.

Entfaltung von PSF und Bild: Der “verwischende” Effekt der Punktverwaschungsfunktion kann nicht zufriedenstellend aus den Bildern herausgerechnet werden, ohne artifizielle Strukturen einzuführen. Das ist zum einen in einem sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis (≈ 4) zu begründen, zum anderen auch eine Folge der Grauwertabhängigkeit des Rauschens. Der ICTM-Algorithmus, der iterativ eine Lösung des inversen Problems anstrebt, eliminiert unter den gegebenen Bedingungen alle hohen Frequenzen im Bild (der Algorithmus zeigt keine Konvergenz) und zeigt damit den hohen Degradierungsgrad der (schwachen) Fluoreszenzsignale durch die Abbildung.

Evaluierung der Segmentier-Algorithmen: Die Messungen mit den Fluoreszenzstandard-Objekten zeigt deutlich, daß auch bei sehr niedrigen Signal/Rausch-Verhältnissen (SNR) eine sinnvolle Segmentierung mit globalem Schwellenwert erfolgen kann. Insbesondere der *Iterative Threshold Selection Algorithm*, ITSA, bewährt sich hier als automatisches Verfahren, um einen geeigneten Schwellenwert zu finden. Sowohl die Standardabweichung als auch die Schwankungsbreite der gemessenen Intensitäten stiegen nicht wesentlich mit der inversen SNR an.

Die Segmentierung der Metaphasechromosomen wurde mit dem Segmentierer mit Hysterese durchgeführt. Die Nähe zum bislang gültigen Literaturwert zeigt, daß, basierend auf diesem Segmentierer, eine erfolgreiche Methode verwendet wurde.

Zur Segmentierung der Chromosomendomänen im Interphasekern der humanen Lymphozyten kann auf das Vorwissen über das (für intakte Zellen konstante) Verhältnis der DNA von Fluoreszenz in situ hybridisierten Domänen und der gesamten Kern-DNA zurückgegriffen werden. Der eigens zu diesem Zweck entwickelte adaptive Segmentieralgorithmus (*Random Walk Segmentation*, RAWS) kann bei geeigneter Parametrisierung die aus diesem Vorwissen resultierenden Zwangsbedingungen erfüllen und seine Parametrisierung ist in Verbindung mit diesem Verwendungszweck weniger willkürlich als die des Segmentierers mit Hysterese. Der Vorteil des adaptiven Segmentierers bei morphologischen Studien ist aber eher gering und muß gegen den Aufwand abgewägt werden, den entsprechenden

Steuerparameter einzustellen.

Interphase-Chromosomen erfordern eine Nachbehandlung, um “Löcher” im Inneren der Domäne zu schließen, gleichzeitig aber die Struktur im Bereich der “*Interchromosomal Domains* (ICDs)” zu erhalten. Der binäre Closing-Operator aus der Mathematischen Morphologie ist hier mit einem kleinen Strukturelement eine brauchbare Wahl. Besser geeignet scheint aber der für diese Arbeit entwickelte Zelluläre Automat zu sein, dessen Entsprechungen in der Mathematischen Morphologie das “Holefilling” oder der “Hit or Miss” Operator sind (Serra 1982).

Biologische Resultate: Alle dreidimensionalen Messungen der homologen Chromosomenpaare 1 geben Hinweise auf die Struktur eines exklusiven Aufenthaltsbereiches dieser Chromosomen (in Einzelfällen sind Berührungen beider Chromosomen zu beobachten). Die Vermutung liegt nahe (zumal sie durch Zorn et al. (1979) eine Bestätigung durch eine alternative Untersuchungsmethode erhalten hat), daß neben den homologen Partner-Chromosomen auch andere Chromosomen nicht in diese Territorien eindringen. Man kann also die Struktur von Domänen annehmen.

Die Basis aller Untersuchungen bildet die Segmentierung, die beide Domänen derart vom Hintergrund isoliert, so daß sich der korrekte relative DNA-Gehalt (in den Segmenten) ergibt. Die individuelle Untersuchung des DNA-Gehaltes der beiden homologen Chromosomen in den einzelnen Zellen zeigt jedoch zum Teil große Abweichungen. Die mittlere Differenz der relativen DNA-Gehalte der Chromosomen bezogen auf den Gesamtgehalt im Zellkern liegt bei 1.36% (Anteil am Gesamt-DNA-Gehalt). Es muß eine ungleichmäßige Hybridisierung in Betracht gezogen werden (Der Segmentierer ist so definiert, daß bei gleichem gemessenen Sondensignal ebenfalls gleiche relative DNA-Gehalte für beide Domänen gefunden werden müssen).

Die Volumina der Lymphozytenkerne und der Chromosomendomänen (Tabelle 11) zeigen starke Schwankungen. Auch die homologen Chromosomen innerhalb eines Kerns weichen diesbezüglich mit einer hohen Standardabweichung voneinander ab. Dagegen steht das Verhältnis der Volumina von Domänen zu Kernen, das sehr präzise (mit kleiner Standardabweichung) bestimmt werden konnte, obwohl Größenunterschiede im Radius des Kerns im Bereich bis zu 1 μm beobachtet werden (Bei einem durchschnittlichen Kernradius von 4 μm ¹⁵). Man kann die Schlußfolgerung ziehen, daß Schwankungen im Kondensationsgrad des Chromatins homogen auftreten.

Der Volumenanteil der beiden hybridisierten Domänen am Gesamtvolumen des Zellkerns ist mit über 13% größer als ihr relativer DNA-Gehalt (10.12%). In Anbetracht der Färbetechnik (FISH), mit der Fluorochrome in die Domänen eingebracht werden, erscheint

¹⁵ Der Kernradius ist während der Messungen mit dem Laserscanning-Mikroskop ohne genaue Quantifizierung abgeschätzt worden.

diese Erhöhung plausibel. In diesem Fall sind neben der zusätzlich eingebrachten DNA, die durch den DNA-Farbstoff berücksichtigt wird, die Farbstoffmoleküle ein relevanter Summand des Volumens.

Bei Auswertung der Oberflächen der Domänen muß bedacht werden, daß Feinstrukturen unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops nicht berücksichtigt werden können. Bei den auftretenden Schwankungen kann es sich durchaus um Meßartefakte handeln.

Die Schwerpunkte (*Center of Mass*, COM) der Domänen des Chromosomenpaares 1 haben einen relativ (in Bezug auf die hohe Variabilität ihrer Oberflächen) konstanten Abstand ($4\text{ }\mu\text{m}$) zueinander. Dies kann durch den hohen Volumenanteil der hybridisierten Chromosomen bedingt sein, ist aber möglicherweise ein Effekt von biologischer Relevanz.

Zu beobachten ist die weitgehende Konstanz der axialen Positionen der Domänen im Zellkern. Bild 19 bestätigt, daß es sich hierbei um einen präparatorischen Artefakt handelt. Der Zellkern liegt flach auf dem Objektträger, und die Domänen breiten sich auf einer "Platte" aus. Bereits mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop ist dieser Sachverhalt zu beobachten. Man erkennt in nahezu allen präparierten Zellkernen diskrete Chromosomendomänen. Überlappungen sind eine seltene Ausnahme. Um so erstaunlicher erscheint in Anbetracht der mechanischen Verformungen die Exklusivität der eingenommenen Territorien.

Neben den quantitativen Untersuchungen gibt auch die qualitative Beurteilung der Visualisierungen Hinweise auf die Chromosomenstruktur in der Interphase. Man erkennt kompakte, überwiegend konvexe Objekte von hoher Variabilität bezüglich ihrer Form. Die polymorphe und kompakte Domäne legt nahe, daß die Chromosomen im Interphase-Kern zwar exklusive Territorien einnehmen, durch den Grad an Dekondensation jedoch verformt werden, um den Zellkern gleichmäßig auszufüllen.

6

Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit hat die wesentlichen Schritte aufgezeigt, um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an den Fluoreszenz in situ hybridisierten Chromosomendomänen in Interphasezellen durchzuführen. Weiterhin sind die vorgestellten Methoden an der Auswertung humaner Lymphozyten demonstriert worden.

Ein wichtiges Charakteristikum optischer Instrumente, dessen experimentelle Bestimmung gezeigt wurde, ist das Auflösungsvermögen bezüglich räumlich getrennter Punktlichtquellen. Diese Information gibt einen Anhaltspunkt darüber, wieviele Meßwerte in einem dreidimensionalen Volumen mit dem konfokalen Mikroskop mindestens aufgezeichnet werden sollten, um die verfügbaren Informationen zu nutzen. Im vorliegenden Fall des Leica TCS 4D ist die Anzahl der lateralen Bildpunkte vorgegeben (512×512 Bildpunkte), so daß eine Überabtastung von $512 \text{ Pixel} / 10 \mu\text{m}$ möglich ist. Um die Verarbeitungszeiten und den Speicherbedarf in einem realistischen Rahmen zu halten, mußte aus diesem Grunde die Anzahl der aufgenommenen Schichten auf 20 reduziert werden.

Das Signal/Rauschverhältnis (SNR) der Aufnahmen hängt wesentlich von den Einstellungen des Detektors und denen der Lochblende ab. Gleichzeitig wird durch die Lochblende das Auflösungsvermögen des Mikroskops beeinflusst. Es wurde gezeigt, wie die RMS (*Root Mean Square*) punktweise berechnet werden kann, um aus dem Histogramm das Verhältnis zwischen der Anzahl von "Rauschvoxeln" und realen Meßwerten zu bestimmen. Mit dieser Information kann der beste Kompromiß aus dem Auflösungsvermögen und der SNR experimentell geschlossen werden.

Die Vorgehensweisen bei Bestimmung weiterer Kenngrößen des Mikroskops wurden dargestellt. Eine objektabhängige Größe (z.B. aufgrund der Art des verwendeten Farbstoffs) ist das Fading, dessen Korrekturkurve an einem Beispiel gemessen worden ist.

Es wurden Wege aufgezeigt, um das Vorwissen aus der Biologie bezüglich der Chromosomendomänen zu nutzen. Die Natur der Domäne (nach derzeitigem Literaturwissen) schließt ein Eindringen von anderem chromosomalen Material als dem Untersuchten aus, so daß ggf. "Löcher" in den segmentierten Bildbereichen durch Anwendung einfacher Zelleröter Automaten, wie dem in dieser Arbeit vorgestellten, geschlossen werden können. Insbesondere wurde ein Segmentierer vorgestellt, der mit der Kenntnis des DNA-Gehaltes des untersuchten Chromosoms eine günstige Parametrisierung erreichen kann, um sinnvoll eine Zuordnung nicht eindeutiger Voxel zum Segment vorzunehmen.

Das Volumen kann überschätzt werden, wenn der gesamte äußere Bereich der Domänen segmentiert wird. Der vorgestellte RAWS- (*Random Walk Segmentation*) Algorithmus sucht in diesem Bereich die hellsten Grauwerte, um einem geforderten DNA-Gehalt gerecht zu werden. Die an der Oberfläche der Domäne, liegenden Löcher dürfen im Gegensatz zu denen im Inneren des Chromosoms nicht aufgefüllt werden, da hier die DNA aus angrenzenden Chromosomendomänen liegen könnte.

Es wurde durch die Vorverarbeitung eine Oberflächendefinition für die Chromosomen-domänen eingeführt, die dem Auflösungsvermögen des Mikroskops entspricht und unabhängig von im Bild enthaltenem Rauschen ist. Somit ist eine physikalisch fundierte Standardisierung dieser Kenngröße erreicht worden.

Nachdem der ITS-Algorithmus sich im direkten Vergleich mit der Bestimmung des Schwellenwertes durch das biologische Vorwissen bewährt hat, kann dieser in zukünftigen, den biologischen Teil dieser Arbeit weiterführenden Studien, eingesetzt werden, um den DNA-Gehalt von Chromosomen im geschädigten Genom (z.B. Schäden durch Bestrahlung) zu bestimmen.

Die morphologische Charakterisierung der Domänen kann erweitert werden, wenn zusätzlich Bereiche der Chromosomen spezifisch markiert werden. Diese Bereiche können z.B. Genloci (Rauch 1998) oder zentromernahe Abschnitte der DNA sein. Aus den gemessenen Distanzen solcher Markierungen können dann ggf. Rückschlüsse auf eine Deformation oder auf andere Aberrationen gezogen werden.

Die Untersuchung anderer Chromosomenpaare muß zeigen, ob der Abstand der Domänen untereinander immer die hier beobachtete Konstanz im Interphase-Kern hat. Durch die parallele Hybridisierung verschiedener homologer Paare kann ein Präparationsartefakt ausgeschlossen werden, sofern die gefundenen Ergebnisse reproduziert werden.

Die parallele Färbung aller Chromosomen kann darüberhinaus eine weitere Bestätigung der bereits durch eine alternative Methode gefundenen (Zorn et al. 1979) Domänenstruktur liefern. Die Theorie der exklusiven Territorien verlangt in mikroskopischen Aufnahmen einen Überlappungsbereich, der durch die Punktverwaschungsfunktion auf den oberflächennahen Bereich limitiert ist.

Adenin Eine *Nukleinbase*, die mit dem *Pyrimidin Thymin* durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ist.

Anisotropie Varianz bzgl. Rotation. Gemeint ist im speziellen die ungleichförmige Verteilung aller Ausbreitungsrichtungen (Es gibt also Vorzugsrichtungen).

Antigen Eine Substanz, die eine Immunantwort auslöst, also die Produktion von *Antikörpern* provoziert und/oder an diesen bindet.

Antikörper Ein Protein, das ein *Antigen* erkennt und hieran bindet.

Basenpaar Ein *Purin*, das über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem *Pyrimidin* verbunden ist.

Binäres Suchen Ein iteratives Verfahren, das den Mittelwert aus einer oberen und einer unteren Abschätzung des *wahren Wertes* verwendet, um diesen zu approximieren.

Beugungsbegrenzung Das physikalische Phänomen der Beugung tritt an den “Rändern” von abbildenden Systemen auf und bewirkt eine Verbreiterung der Abbildung.

Bildstapel Bilder, die in unterschiedlichen axialen Tiefen eines Objekts durch z.B. ein *LSM* aufgezeichnet werden.

Binärbild Ein Bild, in dem jedem *Pixel* beispielsweise der Wert 0 oder 1 in Abhängigkeit von seinem *Grauwert* zugewiesen wird. In der Regel werden Binärbilder durch schwarz/weiße Punkte dargestellt.

cDNA Komplementäre *DNA*, welche durch das Enzym “reverse Transkriptase” an der RNA synthetisiert wird.

Cot1-DNA Schnell “auskühlende”, ubiquitäre und überwiegend repetitive Abschnitte der humanen *DNA*.

Chromatiden Durch Replikation entstehende Untereinheiten des *Chromosoms*, welche durch das *Zentromer* miteinander verbunden sind.

Chromosomal in situ suppression Eine Methode, die parallel zur *FISH*-Technik durchgeführt wird und chromosomen-unspezifische, *denaturierte* Sequenzen der chromosomalen *DNA* durch *Cot1-DNA* sättigt.

Chromosomen Organisationsform des *Chromatins* in Zellen. Ursprünglich als Bezeichnung für den sichtbaren, kondensierten Zustand verwendet, findet der Begriff nach Akzeptanz der Chromosomenindividualität auch Anwendung auf das dekondensierte *Chromatin* in der *Interphase*.

Chromosomendomänen Das Volumen, das exklusiv von einem *Chromosom* während

der *Interphase* eingenommen wird.

CISS *Chromosomal in situ suppression.*

CLSM *Konfokales Laserscanning-Mikroskop.*

Cytosin Eine Nukleinbase, die mit dem *Purin Guanin* durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ist.

DNA Die Desoxyribonukleinsäure ist der wesentliche Faktor der Vererbung. Sie enthält den "genetischen Code".

DNA-Synthese Sie bewirkt die *Chromatidenverdopplung* und ist somit wichtig für die Zellteilung.

Euchromatin Der genetisch aktive, nicht-kondensierte Teil des *Chromatins*

Denaturierung Im Speziellen ist die Trennung der komplementären *DNA*-Einzelstränge gemeint.

Dichroistischer Spiegel Er zeigt Transmissivität für das Licht einer Wellenlänge und Reflexion für Licht einer anderen Wellenlänge.

Domänen *Chromosomendomänen.*

Eindeckmedium Eine Substanz, die das Präparat auf einem Objektträger vollständig einschließt und eine Refraktion an den Übergängen zum Deckglas bzw. Objektträger verhindert.

FISH *Fluoreszenz in situ Hybridisierung.*

FITC *Fluoreszeinisoithiozyanat.*

Fließkomma-Zahl Die Dezimalpunkt-Darstellung einer Zahl, die als $a \cdot 10^{-b}$ geschrieben werden kann, wobei a und b aus der Menge der *Ganzen Zahlen* stammen. Beispiel: $314159 \cdot 10^{-5} \rightarrow 3.14159$.

Fluoreszeinisoithiozyanat Ein Farbstoff, der eine grüne Fluoreszenz zeigt.

Fluoreszenz in situ Hybridisierung Die Hybridisierung einzelsträngiger *DNA* mit *Fluorochrom*-markierter, ebenfalls einzelsträngiger und komplementärer *DNA*.

Fluorochrom Fluoreszenzfarbstoff.

G-Bänder Bereiche des *Chromosoms*, die in der *Synthese-Phase* später synthetisiert wurden als die *R-Bänder*. Durch geeignete Färbemethoden lassen sich streifenförmige Strukturen auf den *Chromatiden* erkennen.

Galvanometer Ein Instrument, das auf elektrostatische Energie durch mechanische Arbeit reagiert. Im Speziellen wird im *LSM* ein Spiegel durch das Galvanometer bewegt.

Gap-Phasen Die Zeitabschnitte zwischen der *Mitose* und der *Synthese-Phase*. Teil des *Zellzyklus*, in dem der aktive Teil der *DNA* transkribiert werden kann und ggf. die Reparatur der *DNA* erfolgt.

Guanin Eine *Nukleinbase*, die mit dem *Pyrimidin Cytosin* durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ist.

Halbwertsbreite Im Speziellen die Distanz zwischen dem Ort des Maximums einer Funktion um dem Ort, an dem die Funktion auf die Hälfte abgefallen ist.

Heterochromatin Der genetisch inaktive, kondensierte Teil des *Chromatins*.

Hintergrund Gemeint ist der Bildbereich, der keine relevanten Informationen enthält.

HWB *Halbwertsbreite*.

ICD *Inter Chromosomal Domain*.

Inter Chromosomal Domain Der Bereich zwischen den *Chromosomendomänen*.

Interphase Der Zeitabschnitt des *Zellzyklus*, in dem das *Chromatin* maximal decondensiert ist und die *DNA* transkribiert und synthetisiert wird.

Isotropie Invarianz bzgl. Rotation. Gemeint ist im Speziellen die gleichförmige Verteilung aller Ausbreitungsrichtungen (es gibt also keine Vorzugsrichtung).

Konfokales Laserscanning-Mikroskop Ein *Scanner*, bei dem Beleuchtung und Abbildung auf den selben Punkt fokussieren und Licht außerhalb des betrachteten Volumenelementes durch *Lochblenden* unterdrückt wird.

Laserscanning-Mikroskop *Konfokales Laserscanning-Mikroskop*.

Lochblende Eine Vorrichtung, um den einfallenden Lichtstrahl zu begrenzen.

LSM *Konfokales Laserscanning-Mikroskop*.

Metaphase Der Teil des *Zellzyklus*, in dem die Chromosomen zusammen mit der Spindel die Metaphaseplatte bilden und besonders gut sichtbar sind.

Metaphasespread Die großflächige Verteilung der Chromosomen wird durch das Entfernen der Zellmembrane erreicht.

Mitose Der Abschnitt des *Zellzyklus* —außerhalb der *Interphase*—, in dem die Zellteilung vorbereitet und durchgeführt wird.

Nukleinbasen Die *Purine Adenin* (A) und *Guanin* (G) sowie die *Pyrimidine Thymin* (T) und *Cytosin* (C) bilden das Alphabet des “genetischen Codes”. Sie treten in der *DNA* in Form der *Basenpaare* AT, TA, GC und CG auf.

Ortsauflösung Die Distanz zwischen zwei Punktlichtquellen, die in der Abbildung getrennt wahrgenommen werden können.

Perzeption Wahrnehmung.

Pinhole Lochblende.

Pixel *Picture Element*.

Point Spread Function *Punktverwaschungsfunktion*.

Preamnealing Gemeint ist die Auskühlzeit repetitiver Sequenzen.

PSF *Punktverwaschungsfunktion*.

Punktverwaschungsfunktion Die Abbildung einer Punktlichtquelle, verursacht durch die Beugungsbegrenzung der Optik.

Purin Ein heterozyklisches Ringgerüst, das mit dem N-9 Atom am C-1 Atom der Desoxyribose bindet. In Folge wird dort ein Wassermolekül freigesetzt.

Pyrimidin Ein heterozyklisches Ringgerüst, das mit dem N-1 Atom am C-1 Atom der Desoxyribose bindet. In Folge wird dort ein Wassermolekül freigesetzt.

R-Band Bereiche des *Chromosoms*, die in der *Synthese-Phase* früher synthetisiert wurden als die *G-Bänder*. Durch geeignete Färbemethoden lassen sich streifenförmige Strukturen auf den *Chromatiden* erkennen.

Renaturierung Gemeint ist die Wiederherstellung der Doppelsträngigkeit der *DNA*.

Repetitive DNA *DNA*, die sich wiederholende Abfolgen identischer *Basenpaar*-Sequenzen enthält. Humane Telomere enthalten beispielsweise Abfolgen der Sequenz TTAGGG.

Synthese-Phase Der Abschnitt des *Zellzyklus*, in dem der doppelte Chromatidensatz durch *DNA-Synthese* erzeugt wird.

Thymin Eine *Nukleinbase*, die mit dem *Purin Adenin* durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ist.

UDS *Unscheduled DNA Synthesis*.

Unscheduled DNA Synthesis Außerplanmäßige Synthese der *DNA* in Folge von Reparaturaktivitäten.

Voxel *Volume Element.*

Zellkern Der Aufenthaltsbereich der *Chromosomen* außerhalb der Zellteilung in Eukaryoten.

Zellzyklus Die Stadien proliferierender Zellen, unterteilt in *Interphase* und *Mitose*.

Zentromer Die Verbindung zwischen den *Chromatiden*.

8

Literatur

- E.J. Ambrose u. D.M. Easty, *Cell Biology*, Thomas Nelson and Sons Ltd., London, 1970
- W. Böcker, W. Rolf, T. Bauch, W.-U. Müller u. C. Streffer, "Automated Comet Assay Analysis", *Cytometry*, 1999, **35**, 134-144
- J.J.W.A. Boei, S. Vermeulen u. A.T. Natarajan, "Dose-response curves for X-ray induced interchanges and interarm intrachanges in human lymphocytes using arm-specific probes for chromosome 1", *Mutat. Res.*, 1998, **404**, 45-53
- T. Boveri, "Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität", *Arch. Zellforschung*, 1909, **3**, 181-268
- D.E. Comings, "The Rationale for an Ordered Arrangement of Chromatin in the Interphase Nucleus", *Am. J. Hum. Genet.*, 1968, **20**, 440-460
- C. Cremer, C. Munkel, M. Granzow, A. Jauch, S. Dietzel, R. Eils, X.-Y. Guan, P.S. Meltzer, J.M. Trent, J. Langowski u. T. Cremer, "Nuclear Architecture and the induction of chromosomal aberrations", *Mutat. Res. Forum*, 1997, **2**, 9-10
- L.M. Cruz-Orive, "Stereology of single objects", *J. Microsc.*, 1996, **186**, 93-107
- A. Dunn, C. Smithpeter, A.J. Welch u. R. Richards-Kortum, "Finite-difference time-domain simulation of light scattering from single cells", *J. Biomed. Optics*, 1997, **2**, 262-266
- R. Eils, S. Ditzel, E. Bertin, E. Schröck, M.R. Speicher, T. Ried, M. Robert-Nicoud, C. Cremer u. T. Cremer, "Three-dimensional Reconstruction of Painted Human Interphase Chromosomes: Active and Inactive X Chromosome Territories Have Similar Volumes but Differ in Shape and Surface Structure", *J. Cell Biol.*, 1996, **6**, 1427-1440
- J.W. Goodman, *Introduction to fourier optics*, McGraw-Hill, New York, 1968
- R.L. Lagendijk, *Iterative Identification and Restoration of Images*, PhD Thesis, Delft Technical University, 1990
- P. Lichter u. T. Cremer, *Human Cytogenetics - A practical approach*, Vol 1, 2nd edition, JRL Press, Oxford, 1992, 158-192
- W.E. Lorensen u. H.E. Cline, "Marching Cubes: a high resolution 3D surface reconstruction algorithm", *Computer Graphics*, 1987, **4**, 163-169
- E.B. van Munster, L.J. van Vliet u. J.A. Aten, "Reconstruction of optical pathlength distributions from images obtained by a wide-field differential interference contrast microscope", *J. Microsc.*, 1997, **188**, 149-157
- J.M. Murray, "Evaluating the performance of fluorescence microscopes", *J. Microsc.*,

1998, **191**, 128-134

T.A. Nagelhus, "Fading Correction for Fluorescence Quantitation in Confocal Microscopy", *Cytometry*, 1996, **23**, 187-195

J. Pauluhn, A. Naujok u. H.W. Zimmermann, "Über die quantitative fluorometrische Bestimmung von DNA mit Ethidiumbromid in der Zelle und die Konstanz der Quantenausbeute des Ethidium-DNA-Komplexes im biologischen Milieu", *Z. Naturforsch.*, 1980, **35c**, 585-598

P. Perona u. J. Malik, "Scale space and edge detection using anisotropic diffusion", *IEEE Transact. Pattern Anal. Machine Intell.*, 1990, **12**, 629-639

C.A. Poynton, " "Gamma" and its Disguises: The Nonlinear Mappings of Intensity in Perception, CRTs, Film and Video", *SMPTE Journal*, 1993, **12**, 1099-1108

W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling u. B.P. Flannery, *Numerical Recipes in C, 2nd edn.*, Cambridge University Press, Cambridge, 1992

J. Rauch, "Spektrale Präzisionsdistanzmessung mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie in der 3D-Genomanalyse", 11th *Heidelberg Cytometry Symposium*, 22.-24. Oktober 1998, ISSN 0949-5347, 53

T.W. Ridler u. S. Calvard, "Picture thresholding using an iterative selection method", *IEEE Trans. Syst. Man Cyber.*, 1978, **8**, 630-632

J. Serra, *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, 1982

J. Sijbers, P. Scheunders, M. Verhoye, A. Van der Linden, D. Van Dyck u. E. Raman, "Watershed-based segmentation of 3d MR data for volume quantization", *Magnetic Resonance Imaging*, 1997, **15**, 679-688

A. Taflovie u. M. Brodwin, "Numerical solution of steady-state electromagnetic scattering problems using the time-dependent Maxwell's equations", *IEEE Trans. Microwave Theory Techn.*, 1975, **23**, 623-630

A.N. Tikhonov u. V.Y. Arsenin, *Solutions of Ill-Posed Problems*, Wiley, New York, 1977

P.J. Verveer u. T.M. Jovin, "Acceleration of the ICTM image restoration algorithm", *J. Microsc.*, 1997, **188**, 191-195

L. Vincent u. P. Soille, "Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations", *IEEE Transact. Pattern Anal. Machine Intell.*, 1991, **13**, 583-598

- J.D. Watson u. F.H.C. Crick, "A structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature*, 1953, **171**, 737
- W. Weller u. H. Winkler, *Elektrodynamik*, Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1979
- T. Wilson, *Confocal Microscopy*, Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, 1990
- K. Yee, "Numerical Solution of Initial Boundary Value Problems Involving Maxwell's Equations in Isotropic Media", *IEEE Trans. Antennas Propagation*, 1966, **14**, 302-307
- P. Zamperoni, *Methoden der digitalen Bildverarbeitung*, Vieweg, Braunschweig, 1991
- Y.J. Zhang, "Evaluation and comparison of different segmentation algorithms", *Patt. Recog. Lett.*, 1997, **18**, 963-974
- R. Zirbel, U.R. Methieu, A. Kurz, T. Cremer u. P. Lichter, "Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries", *Chromosome Res.*, 1993, **1**, 93
- C. Zorn, Christoph Cremer, Thomas Cremer u. Jürgen Zimmer, "Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus", *Exp. Cell Res.*, 1979, **124**, 111-119

Ich danke Herrn Prof. C. Streffer, Institut für Medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen, für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. O. Bryngdahl, Fachbereich Physik, Universität Essen, danke ich für sein großes Verständnis und die anregenden Diskussionen sowie Ermutigungen.

Für die Betreuung der Arbeit sowie den zahllosen anregenden Diskussionen bedanke ich mich insbesondere bei Herrn Dr. W. Böcker.

Für die Herstellung aller biologischen Präparate bedanke ich mich sehr bei Frau S. Nowak, Dr. S. Pils sowie bei Frau A. Kryscio.